ÉVOLUTION DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE (ARN) ET DE L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE (ADN) AU COURS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU CRIQUET MIGRATEUR : *LOCUSTA MIGRATORIA* L. (ORTHOPTERA ACRIDIDAE)

Thérèse MOUREAUX

Station centrale de Zoologie agricole,
Centre national de Recherches agronomiques, Versailles (Seine-et-Oise)

SOMMAIRE

L'évolution des acides nucléiques a été suivie au cours du développement des deux types d'œufs existant chez le Criquet migrateur, les uns étant en effet caractérisés par une évolution continue, les autres présentant un arrêt de développement obligatoire ou diapause.

La méthode utilisée pour l'extraction des acides nucléiques est celle d'OGUR et ROSEN.

Les résultats font apparaître des différences très nettes entre les deux types d'œufs, en ce qui concerne la synthèse des acides nucléiques ; alors que pour les œufs à développement continu les teneurs en ARN et ADN augmentent régulièrement de la ponte à l'éclosion, pour les œufs à diapause on distingue une période de repos séparant deux périodes de synthèse active des acides nucléiques.

Quelques dosages réalisés sur les œufs à diapause ont pu montrer la répartition des acides nucléiques dans l'embryon et dans le vitellus.

Ces données ont été comparées à ce que l'on sait déjà de la biologie et de la physiologie de cet insecte : activités mitotiques, poids, respiration, ainsi qu'à des travaux concernant d'autres insectes : *Melanoplus*, *Bombyx*.

INTRODUCTION

Le travail présenté ici, concerne l'évolution des acides nucléiques au cours du développement embryonnaire de deux sous-espèces du Criquet migrateur :

— *Locusta migratoria cinerascens* FAB.

— *Locusta migratoria gallica* R.

Il pouvait être en effet intéressant d'étudier les variations des quantités d'acide ribonucléique (ARN) et d'acide désoxyribonucléique (ADN) et de les comparer aux phénomènes physiologiques déjà connus pendant cette période chez l'une et l'autre sous-espèce et qui diffèrent de façon considérable.

Avant d'entreprendre d'une part, l'exposé des méthodes utilisées pour l'extraction et le dosage de ces acides, d'autre part les résultats et conclusions qu'il y a lieu d'en tirer, il est nécessaire de résumer les connaissances déjà acquises sur la biologie, et la physiologie de cet insecte, ainsi que les travaux réalisés jusqu'ici sur le matériel embryologique en général, concernant les acides nucléiques.

I. — CARACTÈRES BIOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE L'ŒUF SANS DIAPAUSE ET DE L'ŒUF A DIAPAUSE DE *Locusta migratoria* L.

Le Criquet migrateur présente différents biotypes dont certains sont caractérisés par un développement embryonnaire ininterrompu : *Locusta migratoria cinerascens* FAB. de type polyvoltin, tandis que d'autres présentent un arrêt de développement obligatoire ou diapause : *Locusta migratoria gallica* R. de type univoltin. Cette diapause s'installe toujours à un même stade évolutif qui se situe peu avant le phénomène de blastocinèse, à la fin de la période d'*Anatrepsis* (WHEELER, 1893).

Cette présence de deux types d'œufs n'est d'ailleurs pas une exclusivité de cette espèce. On la retrouve chez le Ver à soie : *Bombyx mori*, chez le Criquet américain : *Melanoplus differentialis*, chez le Grillon australien : *Gryllus commodus*, etc.

De précédentes études, effectuées parallèlement sur le développement de l'œuf sans diapause et sur celui de l'œuf à diapause ont permis de dégager quelques différences d'ordre embryogénique et physiologique. D'une manière générale la température optimale du développement des œufs sans diapause est de 33°C (ROONWAL, 1936-1937 ; HAMILTON, 1936-1950 ; LE BERRE, 1951-1952 ; YAKHIMOVICH, 1950), par contre celle des œufs à diapause est nettement plus basse : 25°C en ce qui concerne les premières étapes du développement (LE BERRE, 1959 ; YAKHIMOVICH, 1950). En particulier on sait maintenant que, comparativement à l'œuf sans diapause, quelle que soit la température, pourvu que celle-ci soit supérieure au zéro de développement, l'œuf à diapause présente certaines déficiences qui se manifestent pendant la période de prédiapause par :

- une croissance pondérale plus faible, bien que, à la ponte, les œufs à diapause pèsent légèrement plus lourds que les œufs sans diapause,
- un développement morphologique plus lent,
- une activité mitotique moins élevée,
- des besoins en oxygène inférieurs.

En outre le développement de diapause se déroulant normalement à des températures modérées, s'accompagne de :

- un arrêt de la croissance,
- une évolution morphologique à peu près nulle,
- une absence de toute activité mitotique,
- des affinités tinctoriales des noyaux vis-à-vis de l'hématoxyline ferrique et de la réaction de Feulgen qui paraissent diminuées,
- des consommations en oxygène remarquablement faibles.

Mais lorsque l'état de diapause se trouve éliminé, après passage au froid par exemple, le développement peut reprendre dès que la température s'élève au-dessus du zéro de développement. Après une période d'initiation de très courte durée, l'évolution morphologique, l'activité mitotique, les consommations d'oxygène, les phénomènes d'organogenèse, deviennent absolument comparables à ce qui se passe chez les œufs sans diapause observés après la blastocinèse.

Ainsi, si l'on compare les deux périodes de développement actif de l'œuf à diapause, à l'évolution de l'œuf sans diapause, on s'aperçoit que seul le développement qui prend place avant l'entrée en diapause présente un réel caractère d'originalité. Mais l'ignorance dans laquelle on se trouve des activités biochimiques qui existent d'abord chez chacun de ces deux types d'œufs, ensuite au cours de la suspension évolutive qui marque le développement de l'œuf à diapause, m'a incitée à entreprendre une première étude relative à l'évolution des acides nucléiques.

2. — REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Il ne s'agit pas ici de passer en revue les nombreux travaux réalisés sur les acides nucléiques pendant l'embryogenèse, mais de montrer la variété de ces recherches dans le choix du matériel ainsi que les différences dans l'évolution des acides nucléiques pendant la croissance des embryons.

BRACHET a admirablement synthétisé les connaissances acquises jusqu'alors dans deux ouvrages : « Biochemical Cytology » (1957) et « The Biochemistry of Development » (1960).

Les recherches portent principalement sur l'embryon de Poulet, de Batracien, d'Oursin, plus rarement sur l'embryon d'Insecte.

Chez l'embryon de Poulet il faut citer les travaux de NOVIKOFF et POTTER (1948) concernant l'évolution des acides nucléiques du 2^e au 20^e jour d'incubation : ceux-ci augmentent régulièrement au cours du développement, la teneur en ARN étant supérieure à celle de l'ADN.

HOFF JORGENSEN (1954) a suivi l'évolution de ce dernier pendant les premiers jours après la mise en incubation et remarque qu'il n'y a pas de synthèse d'ADN avant le 4^e jour en dépit de la segmentation importante et de l'embryogenèse pendant cette période.

SOLOMON (1957 *a, b, c*) remarque que l'ADN est présent en quantités importantes dans le jaune et le blanc de l'œuf de poule. Les dosages réalisés sur l'embryon isolé, montrent que l'ADN augmente régulièrement pendant les premiers jours du développement parallèlement à la multiplication du nombre des noyaux. Cet auteur pense que l'embryon utiliserait la réserve d'ADN du vitellus pour réaliser ses premières divisions ; il donne ainsi une explication à la teneur inchangée de l'ADN, observée par HOFF JORGENSEN dans l'œuf entier, pendant les trois premiers jours du développement.

Chez les Batraciens notons les recherches de HOFF JORGENSEN et ZEUTHEN (1952) sur l'embryon de *Rana temporaria* et *Rana pipiens* ; ils n'observent pas de synthèse d'ADN avant le stade blastula qui correspond à 16 h de développement. Par la suite la quantité d'ADN croît avec un pourcentage d'augmentation variable, celui-ci étant maximum pendant la gastrulation et la neurulation. Cependant que GRANT (1958), travaillant aussi sur l'embryon de *Rana pipiens* observe, contrairement à HOFF JORGENSEN, une synthèse d'ADN pendant les premières divisions de l'œuf ; ces résultats sont en concordance avec ceux plus anciens de KUTSKY (1950), SZE (1953), BRACHET (1954). Une telle synthèse d'ADN aurait lieu en partie aux dépens d'un pool de pré-curseurs : déoxyribosides, déoxyribotides acido-solubles.

STEINERT (1951) dosant l'ARN chez l'embryon de *Rana fusca* remarque qu'il n'y a pratiquement pas de synthèse d'ARN avant la gastrulation ; chez l'embryon d'axolote la synthèse de cet acide nucléique ne débute qu'à partir de la gastrulation ou de la neurulation c'est-à-dire après 4 ou 5 jours de développement.

L'embryon d'Oursin est aussi un matériel couramment utilisé. ELSON, GUSTAFSON et CHARGAFF (1954) remarquent que chez *Paracentrotus lividus* il y a une chute rapide d'ARN immédiatement après la fécondation, suivie d'une augmentation jusqu'au début de la blastula et d'une deuxième augmentation juste avant la gastrulation ; celle-ci correspondrait au déclenchement de la synthèse des protéines. L'ADN augmente en fonction de l'âge et sa courbe de synthèse correspond à celle de l'augmentation du nombre des cellules.

AGRELL et PERSSON (1956) ont travaillé sur trois types d'Oursins.

Chez *Paracentrotus* et *Psammechinus*, ils notent que l'ARN est constant pendant toute la durée de l'évolution embryonnaire tandis que l'ADN commence à être synthétisé au stade de 32 cellules chez le premier et au stade de 100 cellules chez le second. En outre les nucléotides libres subissent une augmentation temporaire au début de la synthèse d'ADN. Chez *Echinus* les deux acides nucléiques n'augmentent qu'à partir du stade de 400 cellules, tandis que les nucléotides libres restent constants. HOFF JORGENSEN (1954) observe chez *Paracentrotus*, ce même palier précédant la synthèse de l'ADN au début du développement.

AGRELL et PERSSON font remarquer que la synthèse de l'ADN débute seulement lorsque la synchronisation des mitoses cesse. De plus, le début de la synthèse d'ADN correspond à une importante synthèse de nucléotides, suivie d'une diminution de ceux-ci, ce qui fait penser à leur rôle possible dans la synthèse de l'ADN.

Quant à l'embryon d'insecte il a été assez peu étudié en ce qui concerne les acides nucléiques. Il y a lieu cependant de signaler les travaux de LU et BODINE (1953) ayant trait aux variations dans la distribution des composés du phosphore pendant le développement embryonnaire de *Melanoplus differentialis*. Ces recherches portent sur les œufs *in toto* et les embryons isolés de la souche présentant une diapause.

L'examen des courbes de variation des composés du phosphore dans le cas des œufs entiers, comme des embryons seuls, montre que les périodes de pré- et postdiapause sont caractérisées par une synthèse importante des deux acides nucléiques et sont séparées par la période de diapause pendant laquelle les synthèses sont à peu près nulles.

Les auteurs remarquent au début du développement une teneur en ARN de l'œuf entier supérieure à celle de l'ADN (d'où le rapport ARN/ADN > 1) alors qu'à la reprise du développement le rapport est inversé ; ils en concluent que l'ARN étant synthétisé avant l'ADN, il « fournirait les matériaux nécessaires à la synthèse de ce dernier ». Comparant les valeurs de phosphore d'acides nucléiques des tissus embryonnaires et du vitellus, LU et BODINE notent que les « deux acides nucléiques sont synthétisés presque entièrement dans l'embryon ».

Pendant la diapause environ un tiers de l'ADN de l'œuf et les trois quarts de l'ARN sont localisés dans le vitellus.

Au cours de ce même travail, ils observent une baisse rapide des phosphores acido-soluble et lipidique dans le vitellus, l'embryon les utilisant pour la synthèse de ses acides nucléiques.

Dans une étude comparable CHINO (1956) a suivi l'évolution des composés du phosphore pendant le développement de l'œuf à diapause et de l'œuf sans diapause de *Bombyx mori*. Il observe d'une part, chez les œufs à développement continu une augmentation régulière des acides nucléiques avec diminution corrélative du phosphore acido-soluble, d'autre part, chez les œufs présentant une évolution comparable à celle signalée chez *Melanoplus differentialis* (LU et BODINE 1953), il existe deux périodes de synthèse des acides nucléiques séparées par une période de repos. Inversement le phosphore acido-soluble constant pendant la diapause, diminue pendant les deux périodes de développement actif.

CHINO observe pendant la diapause des remaniements dans cette fraction : il y a augmentation du « phosphore inorganique » correspondant à une baisse des phosphores respectivement « aisément, difficilement et non hydrolysable ».

De la comparaison des résultats, l'auteur conclut que le métabolisme des composés du phosphore pendant la phase de postdiapause, est semblable à celui des œufs sans diapause après la blastocinèse.

Dans le cas des œufs à diapause il observe que la synthèse d'ADN est plus rapide pendant le développement actif bien que l'ARN soit toujours en quantité plus importante, de sorte que le rapport ARN/ADN est ici toujours > 1 . CHINO fait enfin remarquer qu'il y a une relation intime entre la croissance embryonnaire, l'activité respiratoire (BOELL 1935, ASHBEL 1930) et le métabolisme du P à l'intérieur de l'œuf, que ce soit chez *Melanoplus differentialis* où ces phénomènes sont stoppés à l'entrée de la diapause c'est-à-dire à 20 jours, ou chez *Bombyx mori* où celle-ci débute dès le 2^e jour après la ponte.

Il y a lieu de mentionner aussi les études sur la synthèse de l'ADN pendant le début du développement de la Drosophile (NIGON et DAILLIE, 1958) et pendant les premiers stades de l'embryogénie des Gryllides (DURAND, 1961). Mais ces recherches ne concernent que les premières heures du développement de ces insectes.

En résumé, l'analyse des nombreux travaux réalisés pendant l'embryogénèse met en évidence le degré élevé des synthèses, principalement des acides nucléiques. Alors que l'augmentation d'ADN est en corrélation avec la multiplication du nombre des cellules, celle de l'ARN est plus en rapport avec les processus de différenciation et d'organogénèse. Cependant d'importants problèmes se présentent encore pendant cette période :

- celui de l'origine de l'ADN,
- celui de l'explication de la non-synthèse d'ADN pendant les premières heures de développement, remarquée chez certains animaux,
- celui du rôle de l'ARN,
- celui de l'origine des acides nucléiques présents dans le vitellus et de leur participation dans les synthèses de l'embryon.

Autant de questions auxquelles nous nous efforcerons de répondre à la fin de ce travail en nous appuyant sur les récentes données rassemblées et discutées par BRACHET (1957-1960).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. — MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Le dosage des acides nucléiques porte donc sur les deux sous-espèces d'Acridiens *Locusta migratoria gallica* R. et *Locusta migratoria cinerascens* FAB.

Les œufs de la sous-espèce : *Locusta migratoria gallica* R. pondus à 33°C sont récoltés chaque jour pour être placés à 25°C température optimale de développement. De ce fait, il y aura lieu de tenir compte pour les premiers stades du développement, d'un séjour d'une douzaine d'heures en moyenne à 33°C avant la mise en incubation à 25°C.

Ces œufs présentent une diapause qui s'installe à partir du onzième ou treizième jour à 25°C : le développement embryonnaire ne peut reprendre que dans le cas d'une incubation initiale de soixante jours à cette température suivie d'un séjour au froid (8°C) d'une durée minimum de soixante jours (LE BERRE, 1959). Le développement de postdiapause se déroule à 33°C, température optimale.

Les œufs de la sous-espèce *Locusta migratoria cinerascens* FAB pondus à 33°C sont maintenus à cette température, qui convient le mieux à leur évolution : elle demande environ treize jours. Les données obtenues par les dosages biochimiques ne sauraient évidemment être comparées en fonction de l'âge des œufs et cela pour plusieurs raisons :

- Présence d'un état de diapause chez *Locusta migratoria gallica*.
- Développement en *Anastrepsis* plus lent chez les œufs à diapause.
- Températures optimales de développement différentes.

En conséquence, la comparaison portera sur des œufs dont les embryons ont atteint un même stade morphologique. Elle ne pourra commencer, de ce fait, qu'à partir du moment où ces derniers sont déjà différenciés c'est-à-dire à partir du 2^e jour à 33°C pour les œufs sans diapause, du 4^e jour à 25°C pour les œufs à diapause.

Les dosages ont été effectués d'une part sur des œufs sans diapause *in toto*, d'autre part sur des œufs à diapause *in toto* et sur leurs embryons isolés lorsque leur extraction de l'œuf est aisée (LE BERRE, 1959).

Le procédé utilisé pour séparer les embryons est le suivant : on commence par dilacerer finement les deux extrémités de l'œuf immergé dans une solution de Ringer, puis en appuyant légèrement d'arrière en avant, on oblige l'embryon à sortir brutalement de l'œuf ; celui-ci est expulsé avec un minimum de vitellus et de membranes extraembryonnaires. Il est ensuite aspiré très rapidement, plusieurs fois, à la pipette, ce qui achève de le débarrasser des restes de vitellus et d'amnios. On le dépose alors dans de l'alcool 95° maintenu à la température de 0°C pendant toute la manipulation. Dans le but de faciliter l'opération et de vérifier l'état des embryons *in situ*, on procède à une légère digestion de l'exocuticule par l'hypochlorite de sodium, ce qui permet l'observation par transparence des œufs à la loupe binoculaire. Ce dernier procédé a en outre été utilisé dès le 5^e jour d'incubation à 25°C ou le 3^e jour à 33°C afin d'éliminer du dosage les œufs stériles.

Un échantillonnage des œufs est pratiqué en vue d'homogénéiser les lots expérimentaux et diminuer la variabilité individuelle.

2. — MÉTHODES CHIMIQUES

A) Choix d'une méthode d'extraction en vue de doser l'ARN et l'ADN

Le problème est de doser de façon quantitative les deux acides nucléiques, dans un matériel relativement petit et limité en raison des élevages qu'il nécessite. Trois méthodes classiques de dosage des acides nucléiques peuvent être utilisées :

- la méthode de SCHNEIDER (1945),
- la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945),
- la méthode d'OGUR et ROSEN (1950).

En outre, il y a lieu de signaler la méthode au phénol de KIRBY (1956) adaptée par YAMANA et SIBATANI (1960) pour l'ARN.

Le but recherché n'est pas l'obtention d'un acide nucléique pur et natif, mais d'un acide nucléique plus ou moins dégradé sous forme de nucléotides, obtenu quantitativement, pouvant même contenir des impuretés si celles-ci n'interfèrent pas dans le dosage lui-même.

Dans ces méthodes de dosage le tissu finement divisé est traité par un acide dilué et à froid (acide trichloracétique ou perchlorique) débarrassant le tissu des petites molécules : acides aminés, nucléotides, puis par des solvants, des lipides (alcool, éther). Le résidu contient des protéines dénaturées, des hydrates de carbone, l'ARN, l'ADN. On procède alors à la solubilisation des acides nucléiques.

Après divers essais des différentes méthodes précitées nous avons définitivement choisi la méthode d'OGUR et ROSEN (1950) en dépit des critiques formulées à son sujet quand on l'applique aux tissus animaux, la concordance des courbes obtenues en UV étant satisfaisante.

Description de la méthode.

Après broyage à froid dans l'alcool à 95°, lavages dans l'alcool 90°, 70°, délipidation dans le mélange alcool-éther 3/1 à chaud, le résidu est traité à froid par l'alcool 70° acidifié à 0,1 p. 100 d'acide perchlorique. On renouvelle 5 ou 6 fois ce traitement qui a pour but de solubiliser la plupart des protéines basiques qui interféreraient lors du dosage UV des acides nucléiques.

Deux ou trois lavages dans l'acide perchlorique 0,2 N sont ensuite effectués pour débarrasser le culot des petites molécules : acides aminés, nucléotides libres...

Le résidu est alors traité par l'acide perchlorique normal à froid pendant 18 h : l'ARN passe en solution. On fait enfin agir l'acide perchlorique 0,5 N à 70°C pendant 20 mn pour solubiliser l'ADN.

B) Dosage des acides nucléiques

L'estimation quantitative des acides nucléiques peut s'opérer de trois façons :

- dosage du P ;
- dosage des bases puriques et pyrimidiques par mesure de leur absorption en UV ;
- dosages des sucres : ribose pour l'ARN, désoxyribose pour l'ADN.

a) Mesure de l'absorption en UV.

La méthode d'OGUR permettant d'obtenir l'ARN et l'ADN séparés, la concentration en acide nucléique des extraits peut être mesurée par leur absorption en UV (spectrophotomètre BECKMAN D. K. équipé de cuves en quartz de 1 cm de trajet optique) ; l'aspect des courbes enregistrées permet de juger de la pureté des extraits.

Cette absorption est comparée à celle d'un acide nucléique pur placé dans les mêmes conditions :

- l'ARN de levure qui est en solution dans ClO_4H N, a une densité optique de 0,0213/γ/ml.
- l'ADN de sperme de hareng qui en solution dans ClO_4H 0,5 N a une densité optique de 0,0238/γ/ml.

Ces deux acides n'ont vraisemblablement pas la même proportion en bases puriques et pyrimidiques que l'ARN et l'ADN de Criquet. En effet WYATT (1952) ayant comparé les teneurs en bases de l'ADN de différents animaux observe qu'il y a plus d'adénine et de thymine et moins de guanine, de cytosine et de méthylcytosine dans l'ADN de *Locusta migratoria*, que dans celui de sperme de hareng. Cependant, s'il peut y avoir là une source d'erreur, elle se trouve reproduite pour chaque dosage et, pour l'étude d'un phénomène physiologique ce n'est pas nécessairement la valeur absolue de chaque point de la courbe qui importe mais la comparaison entre les valeurs des différents points.

Les courbes en UV de l'ARN et de l'ADN de Criquet extraits par la méthode d'OGUR sont caractérisées :

- pour l'ARN par un maximum à 260 mμ ;
un minimum à 232-234 mμ ;
- pour l'ADN par un maximum à 265 mμ ;
un minimum à 236-240 mμ.

b) Les résultats obtenus en UV ont été comparés à ceux fournis par le dosage des sucres :

- ribose selon la méthode de MEJBAUM à l'orcinol ;
- désoxyribose selon la méthode de DISCHE modifiée par BURTON (1956) à la diphenylamine.

Ces deux méthodes utilisent les réactions colorimétriques spécifiques des pentoses et des déso-pentoses après avoir soumis l'ARN et l'ADN à une hydrolyse en présence d'un acide concentré.

Mais les difficultés résident dans le calcul de l'ARN et de l'ADN à partir de la teneur en pentose et désoxypentose que l'on a trouvée, d'autant plus que les sucres des nucléotides puriques réagissent davantage que ceux des nucléotides pyrimidiques. Aussi étalonne-t-on le dosage de ces sucres au moyen d'un acide nucléique pur.

- pour le pentose ARN de levure ;
- pour le désoxypentose ADN de sperme de hareng.

Mais, comme dans le cas de l'estimation de la concentration des acides nucléiques par les spectres en UV, on ne peut assurer que l'ARN et l'ADN de Criquet s'hydrolysent et réagissent de la même façon que l'étalon.

Si l'on compare les résultats obtenus par l'UV et par les sucres on note pour l'ADN que les valeurs obtenues par colorimétrie à la diphenylamine encadrent celles trouvées en UV puisque le rapport Diphenylamine/UV varie entre 0,8 et 1,4. Par contre, pour l'ARN, les valeurs en UV sont toujours inférieures à celles fournies par la colorimétrie à l'orcinol le rapport : Orcinol/UV est de 0,5 à 0,8. Les différences ainsi observées paraissent d'autant plus curieuses que la méthode d'OGUR permet d'extraire l'ARN de façon sélective, en effet on n'a pu détecter la présence d'ADN

dans les extraits d'ARN, la réaction à la diphenylamine étant négative ; de même il ne peut y avoir que des traces de protéines les spectres en UV étant ceux d'un acide nucléique.

Il est possible que le manque de concordance entre les résultats obtenus en UV et ceux fournis par la colorimétrie des sucres proviennent de différences d'hydrolyse entre les étalons et les échantillons d'une part, de composition en bases puriques et pyrimidiques d'autre part.

A la suite de multiples essais et comparaisons, seules ont été retenues les valeurs obtenues en UV parce que plus homogènes ; elles sont exprimées en γ (1/1 000 mg) d'acide nucléique pour 50 œufs ou 50 embryons.

Chaque résultat correspond à la moyenne de deux répétitions réalisées par dosage lorsque la quantité de matériel disponible a pu le permettre et dans le cas de différences trop importantes de nouveaux dosages sont opérés sur d'autres lots également échantillonnés au préalable.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. — VARIATIONS DES ACIDES NUCLÉIQUES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DES ŒUFS SANS DIAPAUSE

Ces œufs sont maintenus à 33°C pendant toute la durée de leur développement.

Les dosages ont été effectués de 0,5 jour après la ponte jusqu'à 12 jours (c'est-à-dire un jour avant l'éclosion). Mais ce n'est qu'à partir du troisième jour que les

TABLEAU I

Quantités d'ARN et d'ADN au cours du développement des œufs sans diapause (t 33°C)

Age des œufs en jours	Stades de développement	ARN	ADN	ARN/ADN
0,5		203	45	4,4
1,5	blastoderme	203 ⁽²⁾	60	3,4
2,5	début de formation de l'embryon (écusson)	290	140	2
3	V VI ⁽¹⁾	710	445	1,60
4	VIII IX	750	495	1,51
6	blastocinèse terminée, embryon = 1/2 de l'œuf	1140	1025	1,11
7	embryon remplissant l'œuf, disparition du vitellus	1280	1370	0,935
8	3 jours après blastocinèse	1540	1680	0,915
10	3 jours avant l'éclosion	2700 2625	2660 2450	2555
12	1 jour avant l'éclosion	3000	3000	1

⁽¹⁾ Définition des stades de développement (LE BERRE, 1957).

⁽²⁾ Valeurs exprimées en γ (1/1 000 mg) d'acide nucléique pour 50 œufs.

œufs stériles ont pu être éliminés après digestion de l'exocuticule et examen de l'embryon à la loupe binoculaire.

A 0,5 jour pour 50 œufs il a été dosé 203 γ d'ARN et environ 45 γ d'ADN (tableau 1).

Les acides nucléiques augmentent ensuite à peu près régulièrement au fur et à mesure que les embryons grandissent. On remarque qu'il y a une importante synthèse aussi bien de l'ARN que de l'ADN puisque au cours de ces douze jours de développement le coefficient d'augmentation est de l'ordre de 15 pour le premier et de 65 pour le second.

TABLEAU 2 (a, b.)

Valeurs d'ADN et d'ARN au cours du développement des œufs à diapause

Age des œufs en jours	Stades	ARN		ADN		ARN/ADN	
			moyenne		moyenne		moyenne
I <i>Prédiapause</i> : t = 25°C.							
				a			
1							
3		94 114	104				
4	Ecusson I-II	237	237	186	186	1,27	1,27
6	IV	312 342	327	246 270	258	1,27 1,27	1,27
9	IX	374 398	386	253 290	271	1,47 1,37	1,42
11	XI	460 440 570	510	313 300 425	365	1,47 1,47 1,34	1,4
II <i>Diapause</i> .							
				b			
15	XII	608 580	594	550 525	537	1,1 1,1	1,1
20	—	515	515	535	535	0,96	0,96
29	—	560	560	655	655	0,85	0,85
47	—	487 465	476	562 550	556	0,87 0,85	0,86
60	—	532 488	510	520 510	515	1,02 0,96	0,99
90	—	525 487	506	575 530	553	0,91 0,92	0,915

Le rapport ARN/ADN supérieur à 1 pendant tout le développement d'*Anatrepsis*, devient ensuite inférieur à l'unité alors que l'embryon croît jusqu'à remplir entièrement l'œuf ; il se stabilise aux alentours de 1, à partir du 6^e jour après la ponte.

La plupart de ces dosages pour l'établissement des courbes de variations d'acide nucléique n'ont été réalisés qu'en un seul exemplaire par âge en raison d'une part du manque de matériel, d'autre part, des différences nettes qui séparent chacune des valeurs enregistrées.

II. — VARIATIONS DES ACIDES NUCLÉIQUES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DES ŒUFS A DIAPAUSE

a) *Cas des œufs entiers*

Les œufs pondus à 33°C sont immédiatement placés à 25°C, ainsi que nous l'avons déjà signalé, et maintenus à cette température pendant 60 jours.

Nous n'avons pu doser avec précision l'ARN avant le troisième jour et l'ADN

TABLEAU 2 (c).

III Post-diapause : t = 33°C.

c

Age des œufs en jours	Stades	ARN		ADN		ARN/ADN	
			moyenne		moyenne		moyenne
0 j		410 400 366	392	590 582 580	584	0,7 0,69 0,63	0,67
2	3-4 début de la blastocinèse	710 640	675	800 820	810	0,89 0,78	0,84
2,5	5-6 blastocinèse en cours	820 696	760	930 830	880	0,88 0,84	0,86
3	fin de la blastocinèse	936 814	875	970 924	947	0,96 0,88	0,92
3,5	embryon au 3/4 de l'œuf	960 1 200	1 080	1 050 1 150	1 100	0,91 1,04	0,98
4	embryon remplissant l'œuf	1 400 1 220	1 310	1 350 1 275	1 312	1,035 0,96	0,99
7,5	2,5 jours avant l'éclosion	2 375 2 405	2 390	2 730 2 760	2 745	0,87 0,87	0,87
8,5	1,5 jours avant l'éclosion	3 085 3 350	3 218	3 300 3 150	3 225	0,935 1,06	0,99
9,5	prêts à éclore	3 635 3 500	3 568	3 720 3 180	3 490	0,98 1,1	1,04

avant le quatrième jour même en opérant sur 100 œufs. Ceci pouvait d'ailleurs être prévu en se référant aux résultats obtenus avec les œufs sans diapause incubés à 33°C.

Par la suite, on observe une nette augmentation des teneurs en ADN et en ARN jusqu'au quinzième jour compris, date à partir de laquelle, en dépit des faibles fluctuations observées d'un dosage à l'autre, il ne paraît pas y avoir de synthèse de ces acides (tableau 2 *a, b*).

Même en prolongeant l'incubation initiale à 25°C pendant 90 jours, les quantités d'ADN et d'ARN ne paraissent pas avoir été modifiées de façon importante compte tenu de la variabilité individuelle et de l'absence d'échantillonnage au départ de tous les œufs utilisés. Il faut attendre la reprise du développement qui suit le séjour à 8°C pour reconnaître une nouvelle période d'augmentation en ADN et en ARN (tableau 2 *c*).

Si l'on analyse de plus près ce qui se passe pendant les deux phases de développement actif de l'œuf à diapause quelques faits supplémentaires peuvent être dégagés :

Le taux d'ARN est inférieur à celui d'ADN, pendant la majeure partie de la période de prédiapause : il faut en effet attendre le 20^e jour pour voir le rapport ARN/ADN s'inverser.

L'état de diapause ayant été éliminé par le séjour à 8°C et les œufs mis en incubation complémentaire à 33°C, on note une nette augmentation de l'ARN et de l'ADN dès les deux premiers jours, ce qui correspond à une reprise effective de l'embryogenèse. Par la suite, et cela jusqu'à l'éclosion, les œufs sont le siège de synthèses très importantes de ces acides nucléiques. Il y a lieu toutefois de signaler un accroissement plus important d'ARN comparativement à l'ADN, de telle sorte que pendant cette période de post-diapause le rapport ARN/ADN initialement égal à 0,67 dépasse très légèrement l'unité à l'éclosion.

b) Cas des embryons isolés

Le dosage des acides nucléiques chez les embryons isolés peut être effectué dès qu'ils ont atteint le stade X mais cela soulève de nombreuses difficultés, aussi avons-nous préféré faire les premiers essais sur des embryons un peu moins fragiles, c'est-à-dire au cours de la diapause puis lors du développement de post-diapause.

Pendant la période de diapause la teneur en acides nucléiques varie peu. Il y a une légère augmentation d'ARN et d'ADN tant que les œufs sont maintenus à 25°C (tableau 3) ; pendant la période où ils sont à 8°C on peut considérer que les acides nucléiques sont constants.

Ainsi après 90 jours d'incubation à 25°C, 50 embryons contiennent 251 γ d'ARN. et 290 γ d'ADN ; après 2 à 3 mois de séjour à 8°C ce qui correspond à 0 j 33°C du tableau, il y en a respectivement 237 γ et 303 γ .

Au cours des 4 premiers jours du développement de post-diapause l'augmentation en acides nucléiques est importante ainsi qu'il fallait s'y attendre par ce que l'on sait déjà des œufs in toto (tableau 2).

c) Vitellus

Quelques dosages ont été effectués sur le vitellus après avoir extirpé les embryons des œufs. Les résultats trouvés sont nettement inférieurs à ceux que l'on obtient en

faisant la différence entre l'œuf entier et les embryons isolés. Cela peut être dû au fait que les manipulations se déroulant dans une solution de Ringer, le vitellus s'y trouve dilué. Les acides nucléiques présents pourraient alors subir une dépolymérisation, rendue d'autant plus aisée que la température ne peut être maintenue au-dessous de 0°C pendant toute la durée du prélèvement. De plus, le vitellus est constitué par de nombreuses substances de réserve et il est difficile d'en extraire des acides nucléiques quantitativement et après les avoir débarrassés des produits pouvant interférer dans les dosages.

Le calcul par différence des quantités d'acides nucléiques présents dans le vitellus pendant la diapause montre une légère diminution de ceux-ci. Par contre, il paraît exister à nouveau une synthèse assez importante d'ARN et d'ADN dans le vitellus pendant les quatre premiers jours du développement de post-diapause

TABLEAU 3

Quantités d'ADN et d'ARN présents dans les embryons isolés et dans le vitellus des œufs à diapause

Diapause = 25°C.

Age	Stades	ARN				ADN				ARN/ADN	
		Embryons		Vitellus ¹		Embryons		Vitellus		Em- bryons	Vitel- lus
		Υ	%	Υ	%	Υ	%	Υ	%		
47		220				244					
		211	44,5	264	55,5	230	41,5	326	58,5	0,92	0,81
		202				215					
60		228	45	282	55	300	58,2	215	41,8	0,76	1,31
90		255				296					
		251	49,5	255	50,5	290	52,5	263	47,5	0,865	0,97
		247				284					

Postdiapause : = 33°C.

0		250 228 237 232	60,5	155	39,5	307 307 303 294	52	281	48	0,78	0,55
2	3-4 début blasto- cinèse	272 291 310	43 ?	384	57	540 520 500	64	290	36	0,56	1,32
3,5	embryon au 3/4 de l'œuf	610 680 750	63	400	37	765 767 770	69,7	333	30,3	0,885	1,2

(¹) Les valeurs d'ARN et d'ADN du vitellus pour chaque âge, sont calculées par différence entre la moyenne des dosages des œufs *in toto* (voir tableau précédent) et la moyenne des dosages d'embryons isolés.

puisque le premier passe de 155 γ à 400 γ et le second de 281 γ à 333 γ . Enfin l'accroissement de taille de l'embryon qui conduit celui-ci à remplir entièrement l'œuf entraîne la résorption totale du vitellus dès le 5^e ou 6^e jour à 33°C.

Il est en outre intéressant de comparer les teneurs en acides nucléiques des embryons à celles calculées du vitellus en exprimant les unes et les autres sous la forme de pourcentages dans l'œuf.

On note dans l'intervalle où on a réalisé les dosages une augmentation progressive des taux des deux acides nucléiques dans l'embryon parallèlement à une baisse de ceux-ci dans le vitellus (tableau 3). Mais il y a lieu de faire la différence entre ce qui se passe au cours de la diapause puis pendant la post-diapause.

FIG. 1. — Variation de l'ARN et de l'ADN dosés dans les œufs sans diapause (A), dans les œufs à diapause (B) et leurs embryons isolés (C) pendant leur développement.

Au cours de la diapause, l'absence de toute activité mitotique chez l'embryon n'empêche pas les acides nucléiques d'augmenter légèrement de quantité contrairement à ce qui se passe dans le vitellus. Pendant la reprise du développement, la progression des pourcentages d'ARN et d'ADN dans l'embryon associée à une diminution corrélative de ceux-ci dans le vitellus, s'explique par des synthèses beaucoup plus importantes au niveau du premier. On sait en effet que celui-ci triple de volume au cours de cette période.

Après 4 jours d'incubation à la température de 33°C l'embryon remplit complètement l'œuf, le vitellus ayant été totalement absorbé. En conséquence, on peut considérer qu'à partir de ce moment les courbes de variations des deux acides nucléiques de l'embryon se superposent à celles des œufs entiers.

3. — LOCALISATION DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS L'ŒUF AU COURS DU DÉVELOPPEMENT

La grande quantité d'acides nucléiques trouvée dans le vitellus nous a incité à préciser leur localisation dans l'œuf au cours de son développement. Le repérage

de l'acide désoxyribonucléique a été fait selon la méthode classique de FEULGEN avec une légère coloration de fond par le vert lumière ; celui de l'acide ribonucléique par la méthode de BRACHET (vert de méthyle-pyronine) en réservant une lame sur deux pour une digestion de cet acide à l'aide d'une ribonucléase du commerce. Cela nous a conduit tout d'abord à confirmer les précédentes observations de LU et BODINE (1953) d'une part, de BRACHET (1941) d'autre part, selon lesquels l'ADN se trouve seulement dans les noyaux alors que l'ARN se trouve principalement dans le cytoplasme. En fait, l'examen des noyaux des vitellophages laisse supposer l'absence de cet acide à l'intérieur du noyau car l'action de la ribonucléase n'apporte aucune modification visible de leur colorabilité. Il y a lieu évidemment de rappeler qu'il s'agit là de noyaux très particuliers.

L'observation du vitellus nous a permis de nous rendre compte par ailleurs de deux faits principaux.

Le premier intéresse les noyaux eux-mêmes dont la taille augmente considérablement au cours de tout le développement de l'embryon en *Anatrepsis* puis au cours des premiers jours de développement de post-diapause. Le second fait concerne l'ARN qui paraît se trouver non seulement autour des noyaux des vitellophages mais encore à l'état diffus dans le vitellus.

Il n'est donc pas étonnant que les dosages biochimiques révèlent la présence de grandes quantités d'acides nucléiques dans le vitellus et même leur augmentation pendant la seconde période.

DISCUSSION

I. — COMPARAISON DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES, DU MÉTABOLISME ET DE L'ORGANOGENÈSE ENTRE LES DEUX TYPES D'ŒUFS

Nous avons déjà indiqué que notre matériel d'étude comprenait des œufs à diapause qui, fraîchement pondus, étaient d'un poids légèrement supérieur à celui des œufs sans diapause. Leur hydratation étant à ce moment sensiblement la même, cela entraîne une quantité de matière sèche légèrement plus importante chez les premiers. Par la suite, on sait que le développement des œufs de criquet s'accompagne d'une importante hydratation (ROONWAL, 1936) et que celle-ci se fait proportionnellement à la vitesse de développement (BODINE et ROBBIE, 1943). Cela explique, que, dès les premiers jours le poids des œufs sans diapause rattrape puis dépasse celui des œufs à diapause. Il n'est donc pas possible de rapporter ici, pour une étude comparative, l'augmentation en acides nucléiques à la croissance pondérale des œufs. Par contre une comparaison peut être établie en fonction de mêmes stades évolutifs atteints par les embryons des œufs à diapause et des œufs sans diapause.

Dans le cas où la vérification morphologique sous la loupe binoculaire est possible, c'est-à-dire à partir du stade IV environ, on s'aperçoit que les œufs sans diapause sont nettement plus riches en acides nucléiques que les œufs à diapause. Ainsi pour les stades IV, V et VI qui ne présentent que de faibles différences morphologiques, les dosages effectués chez les embryons sans diapause donnent une valeur supérieure au double de celle trouvée chez les œufs à diapause.

Un peu plus tard lorsque chacun des deux types d'œufs est parvenu au stade IX, les différences observées au niveau de l'ARN et de l'ADN sont encore du même ordre (tableaux 1, 2 a).

Il peut donc être admis que, même pris à des stades morphologiques identiques, les œufs à diapause présentent une certaine déficience en acides nucléiques comparativement aux œufs sans diapause. Cela rappelle les observations de LE BERRE (1959) concernant plus particulièrement l'activité mitotique, mais aussi à un moindre degré la vitesse de développement et les consommations en oxygène. C'est ainsi par exemple, qu'au stade V l'embryon à diapause montre un nombre moyen de mitoses par coupe histologique égal à 11,22 contre 25,54 pour l'embryon sans diapause. Par ailleurs cette activité mitotique atteint un maximum au 11^e jour et diminue ensuite progressivement pour devenir nulle au 16^e jour. Or l'évolution des acides nucléiques se montre très en rapport avec cette observation puisque entre le 11^e et le 15^e jour on note encore une augmentation de leur taux.

Au cours de la diapause, qui se caractérise comme on le sait par l'absence de toute activité mitotique, par des consommations en oxygène très réduites, il ne semble pas exister non plus chez l'œuf in toto de variations sensibles d'ARN et d'ADN. Pourtant si l'on s'adresse aux embryons isolés des œufs entre le 47^e jour et le 90^e jour, on observe une légère augmentation de leur teneur en acides nucléiques que nous tenons à signaler car elle peut être en rapport avec les différenciations aberrantes qui sont observées un peu plus tard surtout au niveau du mésoblaste latéral et du mésoderme splanchnique (LE BERRE, 1959). Il est en outre intéressant de constater que cette légère augmentation en acides nucléiques chez l'embryon s'accompagne d'une diminution corrélative de ces mêmes acides au sein du vitellus. C'est là une question que nous nous proposons de préciser ultérieurement car sa solution peut apporter quelques informations sur les processus d'élimination du phénomène de diapause pour lesquels il n'y a encore aucune explication d'ordre physiologique ou biochimique.

De plus, la juxtaposition des quantités d'ARN et d'ADN trouvées chez les œufs à diapause, alors qu'ils ont repris leur développement et chez les œufs sans diapause, montre une identité de leur augmentation à partir du moment où l'embryon effectue sa blastocinèse (fig. 1). Cette donnée biochimique concorde exactement avec de précédents résultats concernant l'organogenèse et le métabolisme respiratoire (LE BERRE, 1959).

Enfin comme il fallait s'y attendre puisque les œufs à diapause pesaient initialement plus lourds que les œufs sans diapause, la quantité d'acides nucléiques notée juste avant l'éclosion des larves est supérieure chez les œufs à diapause (tableaux 1, 2 c).

2. — COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS A CEUX DE TRAVAUX ANTÉRIEURS CONCERNANT LES INSECTES

Comme nous l'avons déjà mentionné des recherches de même ordre ont été réalisées chez deux autres espèces d'insectes l'une : *Melanoplus differentialis* dont le développement embryonnaire est assez voisin de celui de *Locusta migratoria*, l'autre *Bombyx Mori* qui en diffère de façon très nette.

En effet la diapause s'installe chez les deux premiers alors que l'embryon est morphologiquement bien différencié et se trouve en fin *anatrepsis* ; la seule différence concerne la vitesse de développement de prédiapause qui paraît plus lente à même température chez *Melanoplus*. Par contre, le dernier entre en diapause dès le deuxième jour après la ponte c'est-à-dire au stade blastoderme.

Il y a lieu cependant de signaler que le travail de LU et BODINE (1953) puis celui de CHINO (1956) ont eu pour principal objectif de suivre la destinée des différentes fractions de phosphore au cours de l'embryogenèse sans connaître de préoccupations spéciales concernant le phénomène de diapause. Les deux premiers auteurs après avoir isolé l'ADN et l'ARN par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945), mesurent leur teneur en phosphore par la méthode colorimétrique de FISKE et SUBBAROW (1925). Le troisième auteur commence par doser le phosphore total des acides nucléiques extrait par la méthode de SCHNEIDER (1945), puis déduit de celui-ci l'ADN mesuré selon la méthode de DISCHE (1930) pour obtenir l'ARN.

En ce qui nous concerne, comme nous l'avons antérieurement précisé, les dosages ont été faits directement sur les acides nucléiques isolés selon la méthode d'OGUR et ROSEN (1950).

En dépit d'objectifs et de méthodes différents, nous pouvons cependant comparer un certain nombre de nos résultats avec ceux de ces auteurs.

Dans les œufs de vers à soie, qu'ils soient ou non à diapause (CHINO), comme dans les œufs à diapause de *Melanoplus* (LU et BODINE), le dosage de l'ARN et de l'ADN a pu être effectué dès la ponte ou le jour suivant grâce à la disponibilité d'un grand nombre d'œufs.

En ce qui nous concerne, nous n'avons pu accéder aux premiers jours du développement des œufs de criquet faute de pouvoir disposer pour chaque lot de quantités supérieures à 100 œufs soit 500 mg de poids frais ou environ 35 mg de poids sec. Bien qu'on n'en connaisse pas la proportion exacte, ce poids sec est surtout représenté par des substances de réserve et ne peut donc contenir que de très faibles quantités d'acides nucléiques, ce que confirment d'ailleurs LU et BODINE, CHINO.

L'imprécision du début des courbes de synthèse des acides nucléiques serait donc à éclaircir en utilisant de plus grandes quantités d'œufs et en cherchant à apporter des améliorations à la technique utilisée jusqu'ici (emploi par exemple de cuves en quartz de trajet optique plus grand : 5 à 10 cm, pour les mesures d'absorption en UV) ou encore en faisant appel à d'autres méthodes.

En ce qui concerne le développement des œufs sans diapause, CHINO observe une augmentation constante du phosphore nucléique total. Nos résultats montrent qu'il y a effectivement une synthèse continue de chacun des deux acides au cours de l'embryogenèse du criquet sans diapause. Mais à la différence de ce qui se passe chez l'œuf de ver à soie, le développement embryonnaire du criquet migrateur se caractérise par un taux de synthèse beaucoup plus important. En effet pour le premier le phosphore des acides nucléiques par œuf varie de 0,08 μg à 0,38 μg entre la ponte et l'éclosion, soit un taux d'augmentation voisin de 5. Le second par contre, entre 2,5 jours et 12 jours présente un taux d'augmentation de 25 pour l'ADN et de 21 pour l'ARN (fig. 1, tableau 1). Cela ne doit cependant pas surprendre si l'on se réfère à la taille respective des embryons au moment de leur éclosion.

Nous pouvons en outre signaler l'existence probable de vitesses de synthèses différentes de l'ARN et de l'ADN à certains moments du développement de l'œuf

de criquet comme le suggère le calcul des rapports entre ces deux acides nucléiques tableau 1, fig. 1).

La comparaison des résultats obtenus à partir des œufs à diapause des trois espèces d'insectes révèle tout d'abord une grande similitude dans la forme générale des courbes d'évolution des acides nucléiques. En effet, on assiste au cours de la prédiapause, à une nette augmentation de la teneur des œufs en ADN et en ARN ce qui correspond à la formation du blastoderme pour *Bombyx* à celle d'une bandelette germinative morphologiquement différenciée chez *Melanoplus* et *Locusta*.

La diapause qui correspond à une suspension évolutive de l'embryon est caractérisée par un arrêt des synthèses de ces acides nucléiques. Chez le ver à soie l'ADN et l'ARN demeurent absolument constants pendant toute cette période, que celle-ci se déroule à 25°C, ou à la température du laboratoire, ou encore à 5°C. Les œufs de *Melanoplus* se caractérisent par l'ADN qui reste également constant pendant toute la diapause, et par l'ARN qui subit une légère diminution puisqu'il varie de 1,51 γ P au 20^e jour à 1,25 γ P au 50^e jour. En ce qui concerne l'œuf de criquet, les les quantités d'acides nucléiques ne subissent pas de variations sensibles pendant le développement de diapause à 25°C. Mais le séjour au froid, s'il n'amène aucune modification quantitative notable de l'ADN, provoque une chute assez importante de l'ARN. Ce dernier passe en effet de 500 γ à 400 γ (tableau 2 b, c).

Les dosages faits à ces mêmes périodes sur les embryons ne révélant que de très faibles différences, cela signifie que la diminution d'ARN intéresse principalement le vitellus. Il n'existe pas actuellement de faits expérimentaux qui permettent d'expliquer ce phénomène. Nous pouvons cependant avancer l'hypothèse que celui-ci se se trouve étroitement associé à l'état de diapause et résulte de divers processus de transformations ou de mutations de substances particulièrement au niveau des synthèses protéiques, alors que toute division cellulaire est absente.

Enfin le développement de post-diapause qui conduit l'embryon de la fin *anatrepsis* à son complet développement, s'accompagne d'une augmentation considérable de l'ARN et de l'ADN pour les trois espèces d'insectes.

Cependant comme cela a déjà été indiqué pour les œufs à diapause, le taux d'augmentation des acides nucléiques est nettement plus élevé chez *Locusta migratoria*, surtout en ce qui concerne l'ARN. Ainsi pour *Bombyx Mori* les quantités d'ADN et d'ARN sont respectivement multipliées par 5 et 4,15 entre le moment de la ponte et la fin du développement embryonnaire puisque CHINO note que les teneurs en phosphore d'ADN et d'ARN varient entre ces deux périodes de 0,02 γ P à 0,10 γ P pour le premier et de 0,06 γ P à 0,25 γ P pour le second.

Dans le cas de *Melanoplus differentialis* le taux d'augmentation pour ces deux acides est respectivement de 22 et de 1,7 ; on observe ainsi une synthèse de l'ADN nettement plus élevée que celle de l'ARN ce qui n'est pas noté chez *Bombyx mori* ni chez *Locusta*. En effet pour ce dernier, même en prenant le 4^e jour comme valeur de départ laquelle est évidemment déjà très supérieure à ce que contient l'œuf fraîchement pondu, les taux d'augmentation sont de 18,8 pour l'ADN et de 15,5 pour l'ARN (tableau 2 a, c).

On peut évidemment se demander pour quelles raisons l'œuf du criquet migrateur diffère aussi fortement des deux autres insectes dont l'un (*Melanoplus*) a de nombreux points communs avec lui. S'agit-il d'une question de taille ? Cela pour-

rait être, car dès la ponte, l'œuf de *Locusta* est beaucoup plus lourd que l'œuf de *Melanoplus* et cette différence se retrouve à l'éclosion. De même les œufs de ces deux insectes précités sont beaucoup plus gros que ceux du ver à soie.

D'autres facteurs pourraient cependant intervenir : il vient à l'idée l'accroissement en poids sec ou encore la multiplication cellulaire entre le moment de la ponte et celui de l'éclosion. Malheureusement nous ne possédons à ce sujet aucune possibilité de comparaison.

Si l'on observe la quantité d'ARN par rapport à celle d'ADN dans les œufs à diapause de ces trois espèces étudiées quelques différences sont encore à noter :

Chez *Bombyx mori* pendant toute la durée du développement le rapport ARN/ADN est > 1 ; chez *Melanoplus differentialis* par contre la teneur en ARN supérieure à celle de l'ADN pendant toute la durée de la prédiapause, de la diapause, et du début de la post-diapause lui devient inférieure vers le 5^e jour de la reprise du développement. Chez *Locusta migratoria* comme nous l'avons déjà fait remarquer, le rapport ARN/ADN est > 1 au début du développement, s'inverse entre le 15^e et le 20^e jour (début de la diapause), et devient égal à 1, peu avant l'éclosion (fig. 1). Il y aurait dans ce cas une certaine analogie entre *Melanoplus* et *Locusta*.

LU et BODINE signalent l'existence de deux paliers dans la synthèse de l'ARN des œufs à diapause qui se situent le premier entre le 15^e et le 20^e jour de prédiapause, le second entre le 10^e et le 15^e jour de post-diapause. Ils correspondent à deux périodes où la synthèse de l'ADN est importante ; ce qui amène les auteurs à conclure, compte tenu de l'inversion du rapport ARN/ADN qu'ils observent, que l'ARN pourrait servir à la synthèse de l'ADN. Dans le cas de *Locusta* nous n'avons pas observé de tels paliers, particulièrement en ce qui concerne celui qui se situe pendant la post-diapause. Si ce dernier devait exister, il ne pourrait être que très peu prononcé puisque entre le 4^e jour et le 8^e jour les valeurs d'ADN et d'ARN passent respectivement de 1 300 γ à 1 700 γ et de 1 300 γ à 2 400 γ .

Enfin le fait d'avoir dosé les acides nucléiques chez les embryons isolés de *Melanoplus* et de *Locusta*, permet encore de dégager une différence importante entre ces deux Orthoptères pendant le développement d'Anatrepsis. En effet chez le premier il n'y a que très peu d'ADN dans le vitellus lequel contient par contre la plus grande partie d'ARN. Le second se caractérise par des quantités à peu près équivalentes d'ADN et d'ARN dans l'embryon et dans le vitellus (tableau 3).

3° MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES ET SYNTHÈSE DES PROTÉINES

Les données biochimiques précédentes montrent la liaison intime qui existe entre la synthèse des acides nucléiques et la croissance de l'embryon. Elles peuvent s'insérer dans une vue d'ensemble relative à l'évolution de ces substances au cours de l'embryogenèse observée chez différents animaux. Nous avons passé en revue antérieurement quelques-uns des nombreux travaux réalisés sur la synthèse des acides nucléiques pendant le développement embryonnaire. Divers problèmes se posent concernant leur origine, leur localisation, leur rôle.

Depuis plusieurs années il est généralement admis que la synthèse de l'ADN est liée à la multiplication du nombre de cellules, et celle de l'ARN à la formation des protéines.

Nombreuses sont les recherches sur l'ADN qui ont été réalisées pendant le développement embryonnaire de groupes zoologiques variés. Elles ont donné lieu, en particulier, à différentes hypothèses destinées à définir l'origine et les précurseurs de cet acide nucléique. Selon les auteurs celui-ci pourrait provenir, au début du développement embryonnaire, de l'ARN, d'un ADN cytoplasmique stocké pendant l'ovogénèse, d'un pool de précurseurs de faible poids moléculaire : les nucléotides.

L'idée d'une *synthèse d'ADN nucléaire aux dépens de l'ARN* cytoplasmique de l'œuf revient à BRACHET (1933) ; il avait en effet observé une diminution de l'ARN correspondant à une synthèse d'ADN pendant les premières heures de développement de l'œuf d'oursin.

Elle est également partagée par LU et BODINE (1953). Ces auteurs notent en effet chez *Melanoplus differentialis* des quantités d'ARN supérieures au moment de l'éclosion.

Dans notre matériel, bien que les différences observées entre les teneurs en ARN et en ADN ne soient pas aussi grandes que celles rapportées par LU et BODINE, nous avons toutefois retrouvé ce même phénomène : le rapport ARN/ADN > 1 pendant la pré-diapause devient < 1 au début de la diapause (fig. 1, tableau 2).

Chez les œufs d'oursin ELSON et *al.* (1954) mettent en évidence une chute transitoire de la teneur en ARN juste après la fécondation, suivie d'une synthèse nette pendant les premières divisions et la gastrulation ; l'ADN par contre augmente dès le début.

Cependant les expériences utilisant les isotopes radioactifs montrent de toute évidence que tout l'ADN ne peut provenir de l'ARN (VILLEE et *al.*, 1949 ; ABRAMS, 1951 ; SCARANO et KALCKAR, 1953). En effet l'activité spécifique de l'ADN augmente beaucoup plus que celle de l'ARN pendant le développement des œufs d'oursins (VILLEE et *al.*, 1949) ; en outre ABRAMS (1951) montre que l'incorporation de la glycine radioactive est beaucoup plus forte dans les purines de l'ADN que dans celles de l'ARN. Ce dernier n'est donc pas le précurseur direct de l'ADN ; de plus, cette incorporation ne rend compte que du quart de l'ADN formé et l'auteur de conclure que la synthèse de celui-ci dans l'embryon, comporterait l'utilisation massive d'un précurseur endogène non marqué. En conséquence, comme le dit BRACHET (1957), l'expérience cruciale reste à faire : il s'agirait de marquer de façon spécifique l'ARN de l'ovocyte et de rechercher ensuite si l'ADN des noyaux embryonnaires est effectivement marqué.

Si l'ARN ne constitue pas le principal précurseur de l'ADN des œufs, d'autres origines peuvent être envisagées parmi lesquelles un *ADN cytoplasmique* stocké pendant l'ovogénèse. L'utilisation de la réaction de FEULGEN et des méthodes histophotométriques (ALFERT, 1950 ; VAN DE KERCKHOVE, 1959) ou encore des méthodes chimiques (ENGLAND et MAYER, 1957) ont montré que le noyau de l'ovocyte contient quatre fois plus d'ADN que celui du spermatozoïde. Par contre l'œuf vierge *in toto* en contient des quantités nettement supérieures, ce qui permet de supposer que l'ADN en excès serait localisé dans le cytoplasme et utilisé par l'embryon pour réaliser ses premières divisions.

Dans les œufs d'oiseaux où la quantité de vitellus est plus importante, la réserve d'ADN cytoplasmique est encore plus grande ; les embryons pendant les trois premiers jours du développement l'utiliseraient pour leur synthèse d'ADN. Ceci expliquerait le palier observé par HOFF JORGENSEN pendant ce même temps, l'embryon ne commençant à synthétiser activement son ADN qu'à partir du quatrième jour alors qu'il contient déjà 5×10^7 cellules (HOFF JORGENSEN, 1954 ; SOLOMON, 1957 b).

Cependant, comme le fait remarquer BRACHET (1960), une telle réserve d'ADN cytoplasmique est insuffisante pour expliquer les résultats d'ABRAMS (1951) qui montre que 60 à 70 p. 100 de l'ADN des embryons proviennent d'un précurseur inconnu non marqué.

Dans le cas des œufs de batraciens, HOFF JORGENSEN et ZEUTHEN (1952) et HOFF JORGENSEN (1954) indiquent que la réserve d'ADN cytoplasmique serait suffisante à la production de 5 000 cellules diploïdes, la synthèse d'ADN propre à l'embryon débutant au stade blastula ; SZE (1953), GRANT (1958), BIEBER et *al.* (1959) aboutissent aux mêmes conclusions, bien qu'en désaccord sur les valeurs absolues. Celles-ci sont probablement attribuables aux différences de spécificité des méthodes utilisées. Pour tous ces auteurs d'une manière générale *l'ADN cytoplasmique assurerait une synthèse partielle de la chromatine* pendant la segmentation, la synthèse totale commençant en même temps que les mouvements morphogénétiques.

Cependant si l'existence d'ADN dans le cytoplasme des œufs de toutes sortes d'animaux et sa participation dans la synthèse de la chromatine des noyaux, au début de l'embryogénèse, semble être admise, d'autres précurseurs de poids moléculaire plus faible peuvent être utilisés.

Chez les insectes, SCHULTZ (1956) puis LEVENBOOK, TRAVAGLINI et SCHULTZ (1958) signalent que les œufs vierges de drosophiles contiennent de nombreuses substances libres : purines, pyrimidines, ribosides et désoxyribosides. SCHULTZ (1956) met en évidence la présence de désoxyuridine : substance composée d'une molécule de désoxyribose, sucre caractéristique de l'ADN et d'une molécule de la base pyrimidique caractéristique de l'ARN. Ainsi la synthèse de l'ADN aurait lieu aux dépens de ce pool de substances solubles et de faible poids moléculaire ; l'hypothèse du rôle des produits de dégradation de l'ARN pour la formation de l'ADN n'est pas à rejeter.

Au cours des dosages que nous avons effectués, nous avons remarqué la présence de substances absorbant dans l'UV (maximum d'absorption légèrement inférieur à 260 m μ) ; elles sont solubilisées au cours des lavages dans l'acide perchlorique dilué précédant l'extraction des acides nucléiques. Il serait d'un certain intérêt dans des études ultérieures de les caractériser et de suivre leur évolution pendant tout leur développement embryonnaire, particulièrement dans l'œuf non fécondé et pendant ses premières divisions. Peut-être ont-elles un rôle à jouer pendant la diapause ; CHINO (1956) n'a-t-il pas en effet remarqué chez *Bombyx mori*, pendant cette période des remaniements importants dans la fraction des phosphores acidosolubles ?

SCARANO et KALCKAR (1953) utilisant l'adénine C 14, remarquent dans l'embryon d'oursin, que les *nucléotides acido-solubles* incorporent celle-ci avant les acides nucléiques à un stade où il n'y a pas de synthèse de ces derniers. Par conséquent ces substances de faible poids moléculaire seraient des précurseurs des acides nucléiques.

Ces auteurs ont pu isoler de l'ATP, de l'acide 5-adénylique, ce dernier ayant une activité spécifique élevée. Enfin nous avons déjà mentionné les recherches d'AGRELL et PERSSON (1956). Ces auteurs notent chez *Paracentrotus* et chez *Psammechinus* que les synthèses d'ADN et de nucléotides libres débutent en même temps mais que rapidement on remarque une diminution de ces derniers alors que l'augmentation de l'ADN se poursuit ; par contre chez *Echinus* les nucléotides ne semblent pas jouer un rôle actif.

Chez les amphibiens des recherches semblables ont été réalisées ; STEINERT (1952) remarque dans les œufs de batraciens la présence de grandes quantités de purines libres spécialement d'hypoxanthine ; il a pu montrer le rôle de cette dernière dans la synthèse des acides nucléiques par incorporation d'hypoxanthine marquée (1955). GRANT (1958), BIEBER et *al.* (1957, 1959) signalent qu'il existe dans les œufs de *Rana pipiens* de nombreux composés qui s'accumulent pendant la maturation des ovocytes et interviendraient dans la formation de l'ADN. Ce sont : le désoxyribose, le désoxyribose-phosphate, le désoxyribose-phosphate substitué par des bases dont la thymine principalement.

En définitive nous pouvons conclure sur l'idée de BIEBER et *al.* (1959) selon laquelle la synthèse de l'ADN au cours du début du développement s'effectuerait en trois étapes successives :

- utilisation de précurseurs cytoplasmiques spécifiques de poids moléculaire élevé ;

- utilisation de précurseurs de poids moléculaire plus faible provenant des fractions acido-solubles ;

- synthèse de *novο* comparable à celle qui a lieu chez l'adulte.

Bien qu'à notre connaissance il n'y ait pas eu de recherches concernant le métabolisme de l'ARN pendant le développement embryonnaire, il nous semble important de discuter ici de ce problème en nous basant sur les nombreux travaux qui ont été effectués chez d'autres animaux.

Les méthodes cytologiques et biochimiques ont montré que les jeunes ovocytes contiennent de grandes quantités d'ARN dans leur cytoplasme et dans leurs nucléoles ; BRACHET (1942, 1944) signale que la teneur en ARN des ovocytes d'amphibiens pendant leur vitellogenèse augmente, mais de façon moins rapide que leur croissance ; cet acide nucléique serait ainsi dilué et cela expliquerait la diminution apparente observée par les méthodes cytologiques pendant la vitellogenèse. Les études de BRACHET et FICQ (1956) prouvent que ces ovocytes si riches en ARN sont le siège d'importantes synthèses de protéines. En effet, l'incorporation d'acides aminés marqués dans les protéines, augmente parallèlement à la basophilie des ovocytes. Ces synthèses ont lieu au niveau des microsomes (ou ergastoplasme des cellules intactes, HOAGLAND, 1958), et au niveau des nucléoles. Ces derniers présentent, en effet une taille et une teneur en ARN importantes juste avant la formation du vitellus et plus faibles à la fin de l'ovogenèse (VINCENT, 1955 ; BOLOGNARI, 1956). En conséquence, il y a une corrélation nette entre le développement nucléolaire et la teneur en ARN d'une part, la synthèse des protéines cytoplasmiques d'autre part.

Que devient l'ARN après la fécondation ? ELSON et *al.* (1954) observent chez les œufs d'oursins une chute transitoire d'ARN. Selon BRACHET (1960), la signification de cette chute pourrait s'expliquer par la synthèse d'une nouvelle protéine. La

présence de protéines dans les œufs fécondés, différentes de celles des ovocytes a été démontrée (MONROY, 1957) ; il y aurait une certaine analogie avec l'infection d'une bactérie par un bactériophage où l'inoculation de l'ADN viral est suivie d'un accroissement de l'ARN et de la synthèse protéique (BURTON 1955, JEENER 1959). Pendant les premières divisions, les enzymes ne sont pas encore formées, elles n'apparaissent qu'à partir du stade blastula, sont localisées dans les noyaux (GUSTAFSON et HASSELBERG, 1951), mais peuvent être d'origine cytoplasmique (BRACHET, 1957). Cela expliquerait l'absence de synthèse d'ARN souvent observée pendant les premiers stades. En effet AGRELL et PERSSON (1956) ne notent pas de variation de la teneur en ARN au début du développement de trois espèces d'oursins. ELSON et *al.* (1954) remarquent une augmentation de cet acide à partir de la blastula et à un taux plus important à partir de la gastrula.

Des expériences utilisant les isotopes radioactifs ont apportés des précisions sur la synthèse de l'ARN au début du développement embryonnaire des oursins. VILLEE et *al.* (1949) utilisant comme marqueur le P 32, ABRAMS (1951) la glycine C 14, SCARANO et KALCKAR (1953) l'adénine C 14, remarquent que dans l'embryon au stade blastula (20 h de développement) l'activité spécifique des purines de l'ADN est dix fois celle de l'ARN ; à ce moment, la synthèse d'ARN est faible. Cependant, SCARANO et KALCKAR poursuivant leurs expériences sur des embryons plus âgés observent au stade gastrula (30 h) et au stade pluteus (48 h) une augmentation nette de l'activité spécifique de l'ARN qui va de pair avec une synthèse importante de celui-ci.

Chez les œufs de batraciens STEINERT (1951, 1955) remarque que l'ARN n'augmente qu'à partir de la gastrulation ou de la neurulation. Par l'emploi d'isotopes radioactifs il a pu être montré que le métabolisme des protéines, très lent avant la gastrulation, augmente intensément ensuite. En effet l'incorporation de la glycine (FRIEDBERG et EAKIN, 1949) et de la méthionine (EAKIN et *al.*, 1951) sont à peu près négligeables avant la gastrulation. COHEN (1954) montre que le CO₂ entre facilement dans le cycle de KREBS des œufs de grenouille et est ensuite incorporé dans les protéines et les acides nucléiques. FLICKINGER (1954) précise que cette incorporation est plus intense au moment de la gastrulation.

Enfin NOVIKOFF et POTTER (1948) ramenant en pourcentage de poids sec les teneurs en ARN et protéines au cours du développement embryonnaire du poulet, remarquent que les courbes de variation de ces substances sont tout à fait parallèles.

Ces différents travaux nous montrent qu'il y a une bonne concordance entre la synthèse de l'ARN et celle des protéines. Des recherches semblables pourraient être envisagées chez les insectes.

CONCLUSIONS

Le but de ce travail était de suivre l'évolution des acides nucléiques au cours de l'embryogenèse d'un insecte. Notre choix s'est porté sur le Criquet migrateur : *Locusta migratoria* L. en raison non seulement de la connaissance assez précise que l'on a actuellement de sa biologie, mais aussi de l'existence de biotypes différents dans le déroulement de leur développement embryonnaire.

Certains en effet présentent une embryogenèse continue qui se réalise en treize jours à 33°C : *Locusta migratoria cinerascens* FAB.

D'autres sont caractérisés par une pause temporaire du développement embryonnaire : *Locusta migratoria Gallica* REM.

Nous avons été amenés à rechercher, tout d'abord, une méthode de dosage qui nous permette de doser isolément l'acide désoxyribonucléique et l'acide ribonucléique. Après avoir discuté de la valeur des méthodes d'extraction et de dosage nous nous sommes arrêtés à la méthode d'OGUR et ROSEN pour l'extraction séparée des acides nucléiques, puis leur dosage a été réalisé par mesure de leur absorption en UV. Nous avons été amenés à abandonner les méthodes de dosage par colorimétrie des sucres, celles-ci ne nous ayant pas donné pleine satisfaction.

Notre étude porte principalement sur les œufs en voie de développement ou en diapause, toutefois, lorsque cela fut possible, nous avons parallèlement cherché à voir ce qui se passait chez l'embryon extrait de l'œuf, puis dans le vitellus par différence.

Les résultats obtenus ont été mis en parallèle avec les données déjà acquises sur la biologie du criquet migrateur et concernant en particulier : les vitesses de développement, les taux de croissance, l'activité mitotique, le métabolisme respiratoire.

De précédents travaux du même ordre, réalisés chez d'autres insectes nous ont permis de faire ressortir certaines analogies, mais aussi quelques divergences dans l'évolution des acides nucléiques au cours de l'embryologie de ces différents insectes.

En élargissant la comparaison, afin de tenir compte des résultats obtenus chez de nombreux autres animaux, nous avons pu montrer le caractère universel du métabolisme des acides nucléiques pendant l'embryogenèse. Nous avons insisté particulièrement sur l'origine et les précurseurs de l'acide désoxyribonucléique et sur les relations qui sont susceptibles d'exister entre la synthèse de l'ARN et celle des protéines au cours de cette période du développement.

En définitive les quelques faits précis suivants peuvent être dégagés :

1^o) *Les œufs sans diapause* sont caractérisés par une synthèse en acides nucléiques à peu près régulière au cours de tout leur développement ce qui corrobore les conclusions formulées par CHINO chez *Bombyx mori*. Cependant le taux d'augmentation de l'ARN comme de l'ADN est nettement supérieur chez le criquet.

2^o) *Les œufs à diapause* présentent deux périodes de synthèse des acides nucléiques correspondant à chacune des deux phases actives du développement embryonnaire.

a) Pendant le développement d'*Anatrepsis*, les œufs à diapause sont moins riches en acides nucléiques que les œufs sans diapause. Cette différence existe même lorsqu'on compare des œufs dont les embryons ont atteint un même stade évolutif. Ces résultats sont en accord avec de précédentes données portant en particulier sur les vitesses de développement, l'activité mitotique et les échanges respiratoires. Toutefois, alors que les données d'ordre morphogénique et respiratoire fixent l'entrée en diapause des œufs entre le onzième et le treizième jour d'incubation à 25°C, les dosages des acides nucléiques que nous avons effectués montrent que ceux-ci continuent à augmenter jusqu'au quinzième jour. Ceci peut être mis en parallèle avec l'activité mitotique résiduelle qui a été observée également jusqu'à cette date.

b) Pendant la *période de diapause* les teneurs en acides nucléiques sont à peu près constantes, ce qu'avaient déjà signalé LU et BODINE d'une part, CHINO d'autre part. Nous avons cependant remarqué que le séjour au froid nécessaire à l'élimination de la diapause, s'accompagne d'une chute sensible de la teneur en ARN du

vitellus contrairement à ce qui se passe chez l'embryon où les acides nucléiques semblent à peu près constants. Ce phénomène reste actuellement inexpliqué, mais il n'est pas dit qu'il ne soit en relation avec les possibilités de reprise du développement qu'ont acquis les œufs pendant leur hibernation.

c) Le développement de *Catantrepsis* est caractérisé par une similitude des taux d'accroissement de l'ARN et de l'ADN quel que soit le type d'œufs utilisé.

En définitive, si les faibles dimensions de l'œuf d'insecte peuvent être un écueil, la facilité que l'on a d'obtenir dans certains cas un matériel assez abondant dans des conditions contrôlées, peut être un facteur très favorable pour entreprendre des recherches dans le domaine des acides nucléiques et de leurs précurseurs.

Reçu pour publication en août 1962.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de Biologie cellulaire (Faculté des Sciences de Paris) et les Stations centrales de Zoologie agricole et de Physiologie végétale (Institut national de la Recherche agronomique), en vue d'obtenir le titre de docteur en 3^e cycle dans la spécialité : Physiologie cellulaire.

J'exprime mes sincères remerciements au P^r THOMAS pour les conseils qu'il m'a prodigués et l'honneur qu'il m'a fait d'accepter la présidence du jury, ainsi qu'à MM. POSSOMPES et BARRAUD membres du jury, à M. TROUVELOT, directeur de la Station centrale de Zoologie agricole et à M. COÏC, directeur de la Station centrale de Physiologie végétale, qui m'ont donné toute facilité pour la réalisation de ce travail.

SUMMARY

THE EVOLUTION OF RIBONUCLEIC ACID (RNA) AND DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA) DURING THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF THE MIGRATORY LOCUST : *Locusta migratoria* L.

There are two sub-species of the migratory locust, one, *Locusta migratoria cinerascens* FAB. which follows a continuous life-cycle, and the other, *Locusta migratoria gallica* REM. which is characterized by passing through an embryonic diapause.

Quantitative studies have been made of the nucleic acids present in the developing eggs of both species. Determinations were made of whole eggs and of embryos isolated from the yolk in the sub-species *Locusta migratoria gallica* during diapause and after the recommencement of development. OGUR and ROSEN's method for the extraction of nucleic acids gave the best results and permitted the separate and quantitative determinations of both ribonucleic acid (RNA) and deoxyribonucleic acid (DNA). They were estimated quantitatively from their absorption of ultra-violet (UV) light.

Certain definite facts could be established from this study :

1. The eggs which did not undergo diapause were characterized by a more or less regular synthesis of nucleic acids throughout their development ;

2. The eggs which underwent diapause synthesized nucleic acids during the two active phases of their development :

a) During anatrepsis eggs undergoing diapause were less rich in nucleic acids than the non-diapause eggs, even if identical evolutionary stages were compared. This agreed with previous work on the biology and physiology of eggs subjected to diapause ;

b) During the diapause itself the content of nucleic acids remained more or less constant, except that for the first two days a synthesis of these acids took place. This was in accordance with the residual mitotic activity evident at that period. Furthermore, cooling was accompanied by an appreciable fall in the RNA content of the yolk ;

c) Finally, whatever type of egg was used, the onset of catatrepsis was marked by a similarity in the rates of increase of RNA and DNA.

3. In the embryo the synthesis of nucleic acids was very reduced during diapause at 25°C, zero during the cold period and then very active as development started again. As against this, in the yolk, there was a slight drop in nucleic acids during the diapause which became more marked for RNA in the cold period, and a considerable increase in synthesis in the post-diapause period.

Finally, these results were compared with those previously obtained with *Melanoplus* and *Bombyx*. Widening the comparison to take into account data characteristic of other zoological groups, attention was drawn to the universal occurrence of nucleic acid metabolism during embryogeny. Particular emphasis was given to the origin and the precursors of DNA and to the relations which existed between RNA and protein synthesis during this period of development.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABRAMS R., 1951. Synthesis of nucleic acid purines in the sea urchin embryo. *Exp. Cell Res.*, **2**, 235-242.
- AGRELL I., PERSSON H., 1956. Changes in the amount of nucleic acids and free nucleotides during early development of sea urchin. *Nature*, **178**, 1398-1399.
- ALFERT M., 1950. A cytochemical study of oogenesis and cleavage in the mouse. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **36**, 381-409.
- ASHBEL R., 1930. Sul ricambio gassoso della uova di bachi da seta (*Bombyx mori* L.). *Protoplasma*, **11**, 97-117.
- BIEBER S., SPENCE J., HITCHINGS G., 1957. The isolation and identification of the nucleic acids and their derivatives in the ovum of *Rana pipiens*. *Anat. Rec.*, **128**, 523.
- BIEBER S., SPENCE J., HITCHINGS G., 1959. Nucleic acids and their derivatives in the development of *Rana pipiens*. *Exp. Cell. Res.*, **16**, 202-214.
- BODINE J. A., ROBBIE W. A., 1943. Physiological changes of diapause grasshopper egg (*Melanoplus differentialis* THOS.). II/Changes in density and weight during the development. *Physiol. Zool.*, **16**, 279-287.
- BOELL E. J., 1935. Respiratory quotients during embryonic development (*Orthoptera*). *J. Cell. Comp. Physiol.*, **6**, 369-385.
- BOLOGNARI A., 1956. Particolari manifestazioni del nucleolo degli ovociti in accrescimento di *Haliotis lamellosa lam.* (Moll. Gast. Pros.) e di *Aplysia depilans* L. (Moll. Gast. Opis). *Acta histochem.*, **2**, 229-236.
- BRACHET J., 1933. Recherches sur la synthèse de l'acide thymonucléique pendant le développement de l'œuf d'oursin. *Arch. Biol.*, **44**, 519-576.
- BRACHET J., 1941. The histochemical detection and the micro-determination of pentose nucleic acids (in animal tissues and during embryonic development of amphibians). *Enzymologia*, **10**, 87-96.
- BRACHET J., 1942. Localisation des acides pentose nucléiques dans les tissus animaux et les œufs d'amphibiens en voie de développement. *Arch. Biol.*, **53**, 207-257.
- BRACHET J., 1944. *Embryologie chimique*. Desoer, Liège et Masson Paris.
- BRACHET J., 1954. Constitution anormale du noyau et métabolisme de l'embryon chez les batraciens. *Arch. Biol.*, **65**, 1-71.
- BRACHET J., 1957. *Biochemical cytology*. Academic Press.
- BRACHET J., 1960. *The biochemistry of development*. Pergamon Press.
- BRACHET J., FICQ A., 1956. Remarques à propos du rôle biologique des acides nucléiques. *Arch. Biol.*, **67**, 431-446.
- BURTON K., 1955. The relation between the synthesis of deoxyribonucleic acid and the synthesis of protein in the multiplication of bacteriophage T 2. *Biochem. J.*, **61**, 473-483.
- BURTON K., 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **62**, 315-323.
- CHINO H., 1956. The changes in phosphorus compounds during embryonic development of the silk worm *Bombyx mori*. *Embryologia*, **3**, 167-186.
- COHEN S., 1954. The metabolism of C¹⁴O₂ during amphibian development. *J. Biol. Chem.*, **211**, 337-354.
- DISCHE Z., 1930. Ueber einige neue charakterische Farbreaktionen des Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen. *Mikrochemie*, **8**, 124-138.
- DISCHE Z., 1955. Color reaction of nucleic acid components. in: *The nucleic Acids*, vol. **1**, 267-276, Academic Press.
- DURAND M., 1961. L'acide désoxyribonucléique dans les gamètes et au cours des premiers stades de l'embryogenèse des Gryllides (Orht.) *Bull. Biol.*, **95**, 28-122.

- EAKIN R. M., KUTSKY P. B., BERG W. E., 1951. Protein metabolism of amphibian embryo. III/Incorporation of methionine into protein of gastrulae. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **78**, 502-504.
- ELSON D., GUSTAFSON G., CHARGRAFF E., 1954. The nucleic acid of the sea urchin during embryonic development. *J. Biol. Chem.*, **209**, 285-296.
- ENGLAND M. C., MAYER D. T., 1957. The comparative nucleic acid content of liver nucleic, ova nuclei and spermatozoa of the frog. *Exper. Cell Res.*, **12**, 249-253.
- FISKE C. H., SUBBAROW Y., 1925. The colorimetric determinations of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400.
- FLICKINGER R. A., 1954. Utilisation of $C^{14}O_2$ by developing amphibian embryos, with special reference to regional incorporation into individual embryos. *Exper. Cell Res.*, **6**, 172-180.
- FRIEDBERG F., EAKIN R. M., 1949. Studies in protein metabolism of the amphibian embryo. I/Uptake of radioactive glycine. *J. Exper. Zool.*, **110**, 33-46.
- GRANT P., 1958 a. The synthesis of desoxyribonucleic acid during early embryonic development of *Rana pipiens*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **52**, 227-247.
- GRANT P., 1958 b. The incorporation of P^{32} and glycine 2- C^{14} into nucleic acids during early embryonic development of *Rana pipiens*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **52**, 249-267.
- GUSTAFSON T., HASSELBERG I., 1951. Studies on enzymes in the developing sea urchin egg. *Exper. Cell Res.*, **2**, 642-672.
- HAMILTON A. G., 1936. The relation of humidity and temperature to the development of three species of African Locusts: *Locusta migratoria migratorioides* R. et F., *Schistocerca gregaria* FORSK., *Nomadacris septemfasciata* SERV. *Trans. roy. entomol. Soc. London.*, **85**, 1-60.
- HAMILTON A. G., 1950. Further studies on the relation of humidity and temperature to the development of two species of African Locusts: *Locusta migratoria migratorioides* R et F. and *Schistocerca gregaria* FORSK. *Trans. roy. entomol. Soc. London*, **101**, 1-58.
- HOAGLAND M. B. et al., 1958. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, **231**, 241-257.
- HOFF JORGENSEN E., ZEUTHEN E., 1952. Evidence of cytoplasmic desoxyribosides in the frog's egg. *Nature*, **169**, 245.
- HOFF JORGENSEN E., 1954. Desoxynucleic acid in some gametes and embryos. *Proc. 7th Symp. Colston Res. Soc.*, 79-90.
- JEENER R., 1959. The action of ribonuclease on phage protein synthesis by an induced lysogenic *Bacillus megaterium* culture. *Biochim. Biophys. Acta.*, **32**, 106-116.
- KIRBY K. S., 1956. A new method for isolation of ribonucleic acid from mammalian tissues. *Biochem. J.*, **64**, 405-408.
- KUTSKY P., 1950. Phosphate metabolism in the early development of *Rana pipiens*. *J. Exper. Zool.*, **115**, 429.
- LE BERRE J. R., 1951. Action de la température initiale d'incubation sur la diapause embryonnaire du Criquet migrateur des Landes. *C. R. Acad. Sci.*, **232**, 1870-1872.
- LE BERRE J. R., 1952. Contribution à l'étude du phénomène de la diapause embryonnaire chez un Acridien *L. m. gallica* REM. (Phasis transiens). *Trans. IXth Intern. Entomol. Congr.*, Amsterdam., 209-215.
- LE BERRE J. R., 1959. Caractères biologiques des *Locusta* de la faune de France et étude d'un exemple de diapause embryonnaire. *Ann. Epiph.*, **17**, 101-254.
- LEVENBOOK L., TRAVAGLINI E., SCHULTZ J., 1958. Nucleic acids and their components as affected by the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. I/Constitution and amount of the ribonucleic acids in the unfertilized egg. *Exper. Cell Res.*, **15**, 43. II/Nucleosides and related compounds in the acido-soluble fraction of unfertilized egg. *Exper. Cell Res.*, **15**, 52-79.
- LU K. H., BOSINE J. H., 1953. Changes in the distribution of phosphorus in the developing grasshopper (*Melanoplus differentialis*). *Physiol. Zool.*, **26**, 242.
- MEJBAUM W., 1949. Ueber die Bestimmung kleiner Pentosenmengen insbesondere in Derivative der Adenylsäure. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **258**, 117-120.
- MONROY A., 1957. Adenosine triphosphatase in the mitochondria of unfertilized and newly fertilized sea urchin eggs. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **50**, 73-81.
- NIGON V., DAILLIE J., 1958. La synthèse de l'acide désoxyribonucléique au cours du développement de la Drosophile. *Biochim. Biophys. Acta.*, **29**, 246-255.
- NOVIKOFF A. B., POTTER V. R., 1948. Changes in nucleic acid concentration during the development of the chick embryo. *J. Biol. Chem.*, **173**, 233.
- OGUR E., ROSEN G., 1950. The nucleic acids of plant tissues. I/The extraction and estimation of DNA and RNA. *Arch. Bioch.*, **25**, 262-269.
- ROONWAL M. L., 1936 a. Studies of the embryology of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* R. and F. (Orthoptera, Acrididae). I/Early development and new theory of multiphased gastrulation. *Philos. Trans. roy. Soc. London (B)*, **226**, 391-421.
- ROONWAL M. L., 1936 b. The modifications during the growth and structure of the eggs of *Locusta migratoria migratorioides* R. and F. *Bull. Entomol. Res.*, **27**, 1-14.
- ROONWAL M. L., 1937. Studies on the embryology of the African migratory Locust, *Locusta migratoria migratorioides* R and F (Orthoptera, Acrididae). II/Organogeny. *Philos. Trans. roy. Soc. London (B)*, **227**, 174-247.

- SCARANO E., KALCKAR H., 1953. Nucleic acid synthesis in developing sea urchin embryo. *Publ. Staz. Zool. Napoli*, **24**, 195-215.
- SCHMIDT G., THANNHAUSER S., 1945. A method for the determination of DNA, RNA and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **161**, 83-97.
- SCHNEIDER W., 1945. Phosphorus compounds in animal tissues. I/Extraction and estimation of DNA and RNA. *J. Biol. Chem.*, **161**, 293-305.
- SCHULTZ J., 1956. The relation of the heterochromatic chromosome regions to the nucleic acids of the cell. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **21**, 307-328.
- SOLOMON J. B., 1957 *a*. Increase of deoxyribonucleic acid and cell number during morphogenesis of the early chick embryo. *Biochim. Biophys. Acta.*, **23**, 24-27.
- SOLOMON J. B., 1957 *b*. Nucleic acid content of the egg of the domestic fowl. *Biochim. Biophys. Acta.*, **23**, 211-212.
- SOLOMON J. B., 1957 *c*. Nucleic acid content of early chick embryos and the hen's egg. *Biochim. Biophys. Acta.*, **24**, 584-591.
- STEINERT M., 1951. La synthèse de l'ARN au cours du développement embryonnaire des Batraciens. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 549.
- STEINERT M., 1952. Les nucléotides et les bases puriques libres dans le développement des Amphibiens. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 923.
- STEINERT M., 1955. Incorporation des bases puriques marquées par les embryons de Batraciens. *Biochim. Biophys. Acta.*, **18**, 511-515.
- SZE L., 1953. Changes in the amount of DNA in the development of *Rana pipiens*. *J. Exper. Zool.*, **122**, 577-601.
- VAN DE KERCKHOVE D., 1959. Content of deoxyribonucleic acid of the germinal vesicle of the primary oocyte in the rabbit. *Nature*, **183**, 329.
- VILLEE C., et al., 1949. Incorporation of P³² in the nucleoproteins and phosphoprotein of developing sea urchin embryo. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **33**, 93-112.
- VINCENT W. S., 1955. Structure and chemistry of nucleoli. *Internation. Rev. Cytol.*, **4**, 269-295.
- WHEELER W. M., 1893. Contribution to insect embryology. *J. Morphol.*, **8**, 1-160.
- WYATT G. R., 1952. Specificity in the composition of nucleic acids. *J. Exper. Cell Res.*, **3**, 201-217.
- YAKHIMOVICH I. A., 1950. Changes in the environmental requirements of the Asiatic Locust during embryonic development (en russe). *Dokl. Akad. Nauk S. S. R. (N. S.)*, **73**, 1105-1108.
- YAMANA K., SIBATANI A., 1960. Fractionation of ribonucleic acids with phenol, two metabolically distinct classes of ribonucleic acids in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **41**, 295-303.
-