

L'OVOGENÈSE ET SA RÉGULATION CHEZ LES CRUSTACÉS SUPÉRIEURS

Hélène CHARNIAUX-COTTON

Laboratoire de Sexualité et Reproduction des Invertébrés,
Tour 32, Université Paris VI,
4, Place Jussieu,
75230 Paris Cedex 05

RÉSUMÉ

Dans l'ovaire de *O. gammarellus* et *L. seticaudata* les deux types cellulaires présents, cellules germinales et mésodermiques, forment trois compartiments :

- la zone germinative où se produisent les mitoses goniales ;
- la région de prévitellogenèse. Les ovogonies y commencent leur prophase méiotique, s'entourent de quelques cellules folliculaires et commencent leur croissance ou prévitellogenèse ;
- la région de vitellogenèse dans laquelle le tissu mésodermique est permanent. Les ovocytes s'entourent d'une couche de cellules folliculeuses. Dès que le contact est établi entre cellules folliculeuses et ovocytes, la protéine femelle, présente dans l'hémolymphe, pénètre dans l'ovocyte par micropinocytose. L'étude cytochimique du vitellus a été réalisée.

On peut proposer le schéma suivant pour le contrôle de la vitellogenèse : pendant la saison sexuelle, la folliculogenèse se produit au début de l'intermue quand le niveau d'ecdystérone est bas. L'hormone pédonculaire (VIH) n'est pas libérée. Les cellules folliculaires endocrines provoqueraient la synthèse de vitellogénine.

Pendant la saison de repos sexuel, la sécrétion de VIH empêcherait la transformation endocrine du tissu folliculaire, inhibant ainsi la synthèse de vitellogénine. Il n'y a pas de vitellogenèse même si la folliculogenèse se produit.

Chez les Crustacés Malacostracés (ou Crustacés Supérieurs), nos connaissances concernant le développement ovarien, les phénomènes de l'ovogenèse et leur régulation sont encore limitées à quelques espèces et incomplètes. Les résultats exposés ici sont relatifs à l'Amphipode *Orchestia gammarellus* et la Crevette *Lysmata seticaudata*.

Les individus mâles ou femelles de ces deux espèces possèdent des gonies durant toute leur vie. Pendant la saison de ponte (du printemps à l'automne), une vitellogenèse s'effectue au cours de chaque intermue chez les femelles et une ponte a lieu après chaque exuviation.

I. — ÉTUDE DESCRIPTIVE DE L'OVOGÉNÈSE

L'ovaire est un organe pair, allongé, dont la structure est identique de l'extrémité antérieure à l'extrémité postérieure. Il est constitué par deux catégories cellulaires : les cellules mésodermiques et les cellules germinales.

A. — *La zone germinative*

Chez le jeune *O. gammarellus* encore indifférencié sexuellement, les gonades sont constituées par deux cordons mésodermiques pleins, peuplés de gonies ; ces dernières sont séparées les unes des autres par les cellules mésodermiques (voir CHARNIAUX-COTTON, 1973). Cette structure persiste toute la vie de la femelle (et du mâle) sous forme de zone germinative. La gonade se constitue par la multiplication des cellules mésodermiques tout le long d'une des faces du cordon ; ces cellules entourent les gonies après leur sortie de la zone germinative. La face opposée de cette dernière devient donc une étroite zone longitudinale de la surface de l'ovaire.

Les ovogonies effectuent leur mitose uniquement dans la zone germinative. Celles qui sortent de la trame (par un mécanisme encore inconnu) sont appelées ovogonies secondaires. Elles entrent rapidement en prophase de méiose. Cette donnée, particulière aux Crustacés — existence de cellules mésodermiques inhibant l'entrée en prophase — nous permet d'espérer une approche des mécanismes contrôlant cette entrée, mécanismes encore inconnus chez les Invertébrés et les Vertébrés.

B. — *De l'ovogonie secondaire à la fin de la prévitellogénèse*

Après la disparition des chromosomes, les ovocytes grandissent et des cellules mésodermiques viennent entourer chacun d'eux (voir CHARNIAUX-COTTON, 1973).

La croissance prévitellogénétique est due tout d'abord à une accumulation très spectaculaire de ribosomes libres ; ensuite un reticulum endoplasmique granulaire se développe et synthétise un matériel de nature glycoprotéique qui s'accumule dans des vésicules ergastoplasmiques (ZERBIB, 1973).

C. — *La vitellogénèse*

De nouvelles données acquises chez *O. gammarellus* et *L. seticaudata* permettent de diviser la vitellogénèse en deux phases :

- 1) la folliculogénèse ;
- 2) le grand accroissement.

1. *La folliculogénèse.* Contrairement à ce que l'on pouvait penser, les follicules des ovocytes en vitellogénèse ne résultent pas du développement de ceux des jeunes ovocytes. Ils sont formés par un *tissu mésodermique continu et permanent*. Ce tissu ne présente pas de vague mitotique mais un renouvellement cellulaire discret, comme en témoignent les rares mitoses que l'on peut y observer. Les phénomènes de la folliculogénèse (CHARNIAUX-COTTON, 1974) sont résumés sur la figure 1.

Il existe certainement des interactions entre les ovocytes en fin de PV et le tissu

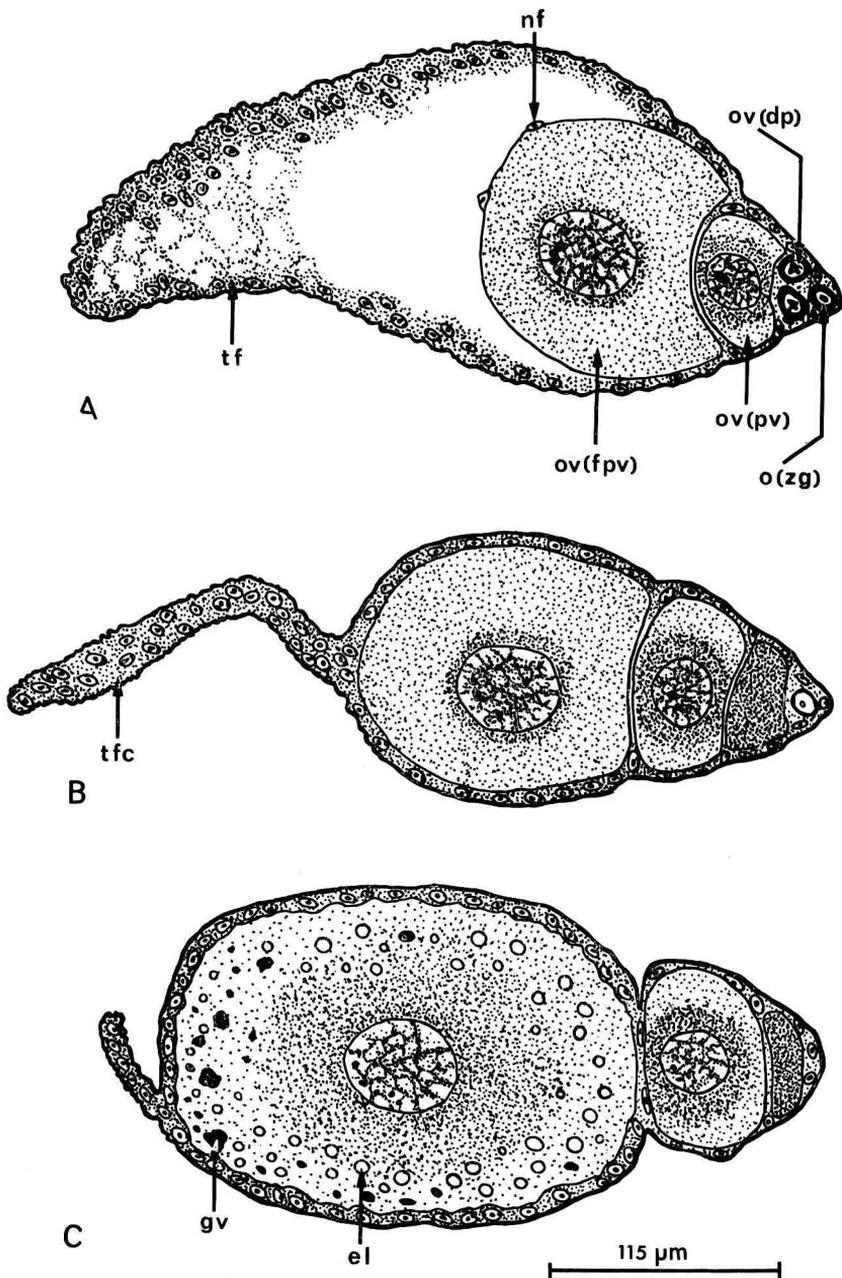


FIG. 1. — Coupes transversales d'ovaire d'*Orchestia gammarellus* montrant divers stades de la folliculogénèse

- A. Ovaire peu après la ponte (Période A de l'intermue). Le tissu folliculaire, continu, qui formait les follicules (une seule couche cellulaire) s'est rétracté. Les cellules semblent nouer de nouvelles relations entre elles de façon à provoquer un aplatissement de l'ovaire.
- B. Période B du cycle d'intermue. Le phénomène de collapsus est terminé et le tissu folliculaire est plaqué contre les ovocytes en fin de prévitellogénèse.
- C. Période C_a du cycle d'intermue. Les ovocytes ont grandi grâce à la formation d'enclaves lipidiques et l'apparition de globules vitellins (due à l'entrée de la protéine femelle). Il ne reste qu'un court cordon de cellules folliculaires.

el : enclave lipidique ; gv : globule vitellin ; nf : noyau de follicule de prévitellogénèse ; o(zg) : ovogonie dans la zone germinative ; ov(dp) : ovocyte en début de prophase (chromosomes visibles) ; ov(fpv) : ovocyte en fin de prévitellogénèse ; ov(pv) : ovocyte en prévitellogénèse ; tf : tissu folliculaire permanent ; tfc : tissu folliculaire à l'aspect de cordon sur coupes.

folliculaire. Il est probable que ce sont les ovocytes en fin de PV qui attirent les cellules folliculeuses autour d'eux (fig. 1, B). Dès que ces dernières sont appliquées contre eux, des globules vitellins apparaissent à leur périphérie, formés par la coalescence de vésicules de micropinocytose (fig. 1, C).

2. *Le grand accroissement.* Quand la folliculogénèse est terminée, la micropinocytose s'intensifie et les globules vitellins s'accroissent rapidement grâce à l'entrée massive de la protéine femelle (voir ci-dessous). Il y a également une forte synthèse endogène conduisant à l'accroissement des enclaves lipidiques.

TABLEAU I

Principaux caractères cytochimiques des enclaves vitellines de l'ovocyte d'Orchestia gammarellus

Réactions	Fixateurs	Vésicules ergastoplasmiques	Globules vitellins	Globules lipidiques
<i>Polysaccharides</i>				
A. P. S.	Halmi ; Bouin	+++	+++	—
Acétylation + A. P. S.	— —	+++	+++	—
P. A. T. Ag (Thiéry)	Glutaraldéhyde + tétroxyde d'osmium (microscopie électronique)	très faible ou —	—	—
P. T. A. (Rambourg)	Glutaraldéhyde (microscopie électronique)	+ ou —	+	—
<i>Protéines</i>				
Ninhydrine-Schiff	Carnoy ; formol salé	++	++	—
D. D. D.	— —	—	+	—
Thioglycolate-D. D. D.	— —	++	++	—
<i>Lipides</i>				
Noir Soudan	Da Fano ; Baker	—	—	+++
Rouge à l'huile O	Baker ; Ciacco	—	—	+++
Bleu de Nil acétifié à 1 %	Baker ; matériel frais	—	—	rose
Procédé Bourgeois et Hubbard	Baker + bichromate de Ca	—	+	—
Fluorescence verte (caroténoïdes)	matériel frais	—	+	—

+ : Réponse positive

+++ : Réponse fortement positive

— : Réponse négative.

L'étude cytochimique (ZERBIB, 1976) montre que (voir tabl. 1) :

- les vésicules ergastoplasmiques (qui sont surtout actives durant la prévitellogénèse) contiennent beaucoup de protéines et peu de sucres ;
- les globules vitellins sont également riches en protéines, pauvres en sucres et contiennent des lipides et du carotène ;
- les enclaves lipidiques sont des glycérides saturés ;
- les granules corticaux sont de nature glycoprotéique.

D. — *L'ovogenèse durant la période de repos génital*

L'ovogenèse se poursuit durant l'hiver. Chez certaines femelles d'*O. gammarellus*, elle s'arrête en fin de prévitellogenèse alors que chez d'autres, la folliculogenèse a lieu et un début de grande croissance peut même s'effectuer.

Chez *L. seticaudata*, le tissu folliculaire permanent forme un épais tissu cortical ; quelques follicules se forment autour de certains ovocytes mais ces derniers dégénèrent rapidement (CHARNIAUX-COTTON et TOUIR, 1973).

E. — *La protéine femelle (PF)*

Il existe dans l'hémolymphe des femelles de Malacostracés une lipoglycocaroténoprotéine, absente de l'hémolymphe des mâles. Chez *O. gammarellus*, cette protéine femelle (PF) est immunochimiquement identique au constituant protéique majeur du vitellus (MEUSY, 1972).

L'hémolymphe des femelles en repos sexuel (hiver) ne présente plus la PF ou seulement des traces.

Diverses expériences ont permis de démontrer que ce sont les ovaires qui contrôlent la synthèse de la PF (MEUSY, JUNERA, CROISILLE, 1971 ; CROISILLE *et al.*, 1974). Le lieu de synthèse est encore inconnu.

TABLEAU 2

*Incorporation de la leucine tritiée au niveau de la protéine femelle de l'hémolymphe de femelles d'Orchestia gammarellus en reproduction, selon les différents stades de l'intermue. La durée d'incubation est de 6 heures. Pour plus de détails techniques, voir MEUSY *et al.*, 1974.*

Stade de l'intermue	Radioactivité en c.p.m., rapportée à 3 µl d'hémolymphe
A	339
A	311
B	233
B	172
B	245
C _a	1 928
C _b	20 923
C _c	12 804
D ₀	16 489
D _{1a} '	23 300
D _{1c} '	13 444
D ₂ (début)	9 333
D ₂	2 393
D ₂	7 742

Des injections de leucine tritiée ont été effectuées aux différents stades de l'intermue (et donc de la vitellogenèse) (MEUSY, JUNERA, CROISILLE, 1974). Elles ont permis d'obtenir les résultats portés dans le tableau 2. Ils montrent qu'au début

de l'intermue (période A), la synthèse de PF est très faible. A l'étape C_b de l'intermue, c'est-à-dire au moment où se termine la folliculogénèse, la synthèse augmente brusquement et reste élevée jusqu'au début de l'étape D₂. Elle diminue au cours de cette dernière qui est la fin du cycle d'intermue et de la vitellogénèse.

La synthèse de PF est arrêtée durant la saison de repos sexuel.

F. — Conclusions

L'étude de la structure ovarienne montre qu'à partir de deux types cellulaires : cellules mésodermiques et cellules germinales, des interrelations entre ces cellules créent des compartiments dans l'ovaire : la zone germinative, la région de prévitellogénèse, la région de vitellogénèse. Le tissu permanent qui forme les follicules autour des ovocytes en début de vitellogénèse doit jouer un rôle dans l'entrée massive de la PF encore appelée vitellogénine.

II. — CONTRÔLE DE L'OVOGÉNÈSE

A. — Inhibition de la vitellogénèse

La prévitellogénèse ayant lieu toute l'année, chez *O. gammarellus* comme chez *L. seticaudata*, n'est probablement pas contrôlée. La reproduction est donc régulée au niveau de la vitellogénèse.

Il est bien connu que la neurosécrétion « pédonculaire » (Organe x-glande du sinus) exerce un effet inhibiteur sur la vitellogénèse.

B. — Signal positif de vitellogénèse

Chez *O. gammarellus* et *L. seticaudata*, il existe de plus, au début de l'intermue, un signal positif de démarrage de la vitellogénèse (CHARNIAUX-COTTON, 1973). Ce signal est peut-être constitué par le taux minimal d'ecdystérone dans l'hémolymphe au début de l'intermue. En effet, l'injection d'ecdystérone tout au début de l'intermue chez *L. seticaudata* (TOUR et CHARNIAUX-COTTON, 1974) et chez *O. gammarellus* (BLANCHET, 1972 et non publié) inhibe la vitellogénèse ; les doses d'ecdystérone utilisées sont environ 11 µg/g de poids frais chez *L. seticaudata* et 200 µg/g chez *O. gammarellus*.

L'étude histologique des ovaires montre que, chez *L. seticaudata*, la folliculogénèse ne s'effectue pas quand l'hormone de mue est injectée peu avant ou après l'exuviation (Pl. I, B). Dans le cas d'injections à la fin de la période A, les follicules se constituent autour des ovocytes en fin de prévitellogénèse mais la vitellogénèse ne se fait pas. Chez *O. gammarellus*, la folliculogénèse s'effectue presque totalement (Pl. I, A) mais le grand accroissement n'a pas lieu et les ovocytes dégénèrent.

Les injections d'ecdystérone pratiquées après la fin de folliculogénèse, chez les deux espèces, n'inhibent pas la vitellogénèse.

C. — *Proposition d'un schéma du contrôle de la vitellogenèse*

Chez *O. gammarellus* et *L. seticaudata*, il existe un signal de démarrage de la vitellogenèse lié à l'exuviation. Le taux bas d'ecdystérone au moment de la mue semble constituer ce signal. En effet, l'injection d'ecdystérone peu après la mue inhibe la folliculogénèse et la vitellogenèse chez *L. seticaudata*. Chez *O. gammarellus*, la folliculogénèse s'effectue partiellement après l'injection mais la vitellogenèse est abortive.

En été, l'hormone pédonculaire (VIH) n'est pas libérée ; le tissu folliculaire permanent deviendrait endocrine quand la folliculogénèse est terminée. Il déclencherait la synthèse de la PF, ce qui permettrait une entrée massive de cette dernière dans les ovocytes. Rappelons que le tissu folliculaire contrôle probablement la formation des soies ovigères (CHARNIAUX-COTTON, 1957).

En hiver, il y a libération d'hormone pédonculaire inhibitrice de la vitellogenèse. L'ovaire ne peut devenir endocrine même si la folliculogénèse a pu s'effectuer. Le taux de PF dans l'hémolymph reste alors trop bas pour permettre une vitellogenèse complète (il n'y a pas, non plus, formation de soies ovigères).

Ainsi, l'ovaire, en l'absence de la neurosécrétion gonadotrope, régulerait la synthèse de sa vitellogénine.

Colloque D. G. R. S. T., Biologie de la Procréation, Paris, 7-8 mars 1975.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de l'aide de la D. G. R. S. T., contrat n° 74-70021.

SUMMARY

OOGENESIS AND ITS REGULATION IN MALACOSTRACAN CRUSTACEA

Oogenesis and its regulation are studied in two Malacostracan crustacea : the amphipod, *Orchestia gammarellus* and the prawn, *Lysmata seticaudata*.

The ovary is constituted of two tissues only, germinal cells and mesodermic cells. Their interrelations vary with the stage of oogenesis, forming compartments within the ovary. These are :

— the germinative zone where gonia mitosis occurs ; the zone subsists for the life of the animal ;

— the previtellogenic region where the oogonia begin meiotic prophase after leaving the germinative zone. They then acquire a follicle with relatively few nuclei and undergo first growth or previtellogenesis ;

— the vitellogenic region in which, according to recent findings, the mesodermic tissue is permanent. Its cells can modify the membrane junctions. After oviposition, mesodermic cells move to form a single-layer follicle (« folliculogenesis ») around oocytes which are at the end of previtellogenesis. Vitelline globules do not appear until the follicular cells are in contact with the oocyte. These cells are probably necessary for the penetration of vitellogenine (a female specific protein present in hemolymph) into the oocyte by micropinocytosis. Synthesis of this protein increases sharply at the end of folliculogenesis.

Chemical nature of the vitellus has been studied using cytochemical methods in *O. gammarellus*.

It is well known that a neurosecretion produced by the X-organ sinus gland complex inhibits ovarian activity. Indeed, since this inhibition takes place at vitellogenesis, the hormone is a VIH. We have shown a brief, positive signal (possibly a drop in ecdysterone titer at beginning of intermolt) which triggers vitellogenesis. Low ecdysterone titer would permit folliculogenesis cell movements to occur. In fact injection of ecdysterone at the beginning of intermolt inhibits folliculogenesis either completely (in *Lysmata seticaudata*) or partially (in *Orchestia gammarellus*), and there is no vitellogenesis. Ecdysterone has no effect, if injected after the end of folliculogenesis.

The following scheme is proposed for control of vitellogenesis :

During the breeding season, folliculogenesis takes place at the beginning of intermolt when ecdysterone titer is low ; VIH is not released. After folliculogenesis, the follicular cells become probably endocrine : they trigger synthesis and release of a large amount of female specific protein (vitellogenin) which enters the oocyte.

During the season of genital repose, release of VIH could prevent the follicular tissue from becoming endocrine. Without vitellogenin synthesis, there is no vitellogenesis, even if folliculogenesis takes place.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BLANCHET M.-F., 1972. Effets sur la mue et sur la vitellogénèse de la β -ecdysone introduite aux étapes A et D₂ du cycle d'intermue chez *Orchestia gammarella* (PALLAS) (Crustacé, Amphipode). Comparaison avec les effets de la β - et de l' α -ecdysone aux autres étapes de l'intermue. *C. R. Acad. Sci. Paris*, D, **274**, 3015-3018.
- CHARNIAUX-COTTON H., 1957. Croissance, régénération et déterminisme endocrinien des caractères sexuels d'*Orchestia gammarella* (PALLAS) (Crustacé Amphipode). *Ann. Sci. Nat.*, **19**, 411-559.
- CHARNIAUX-COTTON H., 1973. Description et contrôle de l'ovogénèse chez les Crustacés supérieurs. *Ann. Biol. anim., Biochim. Biophys. Fr.*, **13**, 21-30.
- CHARNIAUX-COTTON H., 1974. Données nouvelles concernant la vitellogénèse des Crustacés Malacostracés obtenues chez l'Amphipode *Orchestia gammarellus* (PALLAS) : folliculogénèse à partir d'un tissu permanent ; action du busulfan ; action inhibitrice de l'hormone juvénile. *C. R. Acad. Sc. Paris*, D, **279**, 563-566.
- CHARNIAUX-COTTON H., TOUIR A., 1973. Contrôle de la prévitellogénèse et de la vitellogénèse chez la Crevette hermaphrodite *Lysmata seticaudata* RISSO. *C. R. Acad. Sc. Paris*, D, **276**, 2717-2720.
- CROISILLE Y., JUNERA H., MEUSY J.-J., CHARNIAUX-COTTON H., 1974. The female-specific protein (vitellogenin protein) in Crustacea with particular reference to *Orchestia gammarella* (Amphipoda). *Amer. Zool.*, **14**, 1219-1228.
- MEUSY J.-J., 1972. *La gamétogénèse et la fraction protéique de l'hémolymphe spécifique du sexe femelle chez quelques Crustacés supérieurs : étude descriptive et rôle des glandes androgènes*. Thèse d'état Paris VI, n° C. N. R. S. : AO 6583.
- MEUSY J.-J., JUNERA H., CROISILLE Y., 1971. Recherche de la « fraction protéique femelle » chez les Crustacés Amphipodes *Orchestia gammarella* ayant subi une inversion expérimentale du sexe. *C. R. Acad. Sci. Paris*, D, **273**, 592-594.
- MEUSY J.-J., JUNERA H., CROISILLE Y., 1974. Données sur la synthèse de la fraction protéique femelle chez *Orchestia gammarella* PALLAS (Crustacé Amphipode), au cours de l'intermue et chez les femelles en repos sexuel. *C. R. Acad. Sci. Paris*, D, **279**, 587-590.
- TOUIR A., CHARNIAUX-COTTON H., 1974. Influence de l'introduction d'ecdystérone sur l'exuviation et le démarrage de la vitellogénèse chez la Crevette *Lysmata seticaudata* RISSO. *C. R. Acad. Sci. Paris*, D, **278**, 119-122.
- ZERBIB C., 1973. Contribution à l'étude ultrastructurale de l'ovocyte chez le Crustacé Amphipode *Orchestia gammarella* PALLAS. *C. R. Acad. Sci. Paris*, D, **277**, 1209-1212.
- ZERBIB C., 1976. Nature chimique des enclaves vitellines de l'ovocyte du Crustacé Amphipode *Orchestia gammarellus* (PALLAS). *Ann. Histochim. Fr.*, **21** (sous presse).

PLANCHE

PLANCHE I

*Coupes transversales d'ovaires
après injection d'ecdystéronne au début de l'intermue*

A. *Orchestia gammarellus*. La folliculogénèse ne se termine pas et l'ovaire reste bloqué au stade atteint au début de la période C du cycle d'intermue (voir fig. I, C) (BLANCHET, non publié).

B. *Lysmata seticaudata*. Une folliculogénèse s'est effectuée autour de quelques ovocytes périphériques qui dégénèrent ; des amas de tissu folliculaire sont visibles (TOUR, non publié).

acf : amas de cellules folliculaires ; cf : noyau d'une cellule folliculaire ayant migré contre l'ovocyte ; cfl : cellule folliculaire « libre » n'ayant pas migré contre l'ovocyte ; eg : enclave lipidique ; gv : globule vitellin ; od : emplacement d'un ovocyte dégénéré ; odp : ovocyte en début de prévitellogénèse (chromosomes visibles) ; odv : ovocyte en début de vitellogénèse (voué à la dégénérescence) ; opv : ovocyte en prévitellogénèse ; zg : zone germinative.

