

# Sur le développement abortif de certains embryons de *Lineus ruber* (O.F. Müller) (Hétéronémertes)

MARIE JOSÈPHE ALLUCHON-GERARD et MARIE GONTCHAROFF

Laboratoire de Biologie cellulaire et Centre de Biologie du Développement,  
Reims, France

Reçu le 25 Août 1969

## *Abnormal development of some embryos of Lineus ruber (O. F. Müller)* (*Heteronemertine*)

*Summary.* One can observe in the case of *Lineus ruber*, two types of development in the same egg string, a normal one and an abortive one. The eggs which give the normal embryos, give two polar bodies while the eggs which give the abnormal embryos, issue one polar body only, they are not fertilized but start to divide and belatedly reach the stade of 16—32 blastomeres.

The existence of an abortive parthenogenesis is suggested and the mechanism of abnormal development is discussed.

*Sommaire.* Chez *Lineus ruber* on observe deux types de développement dans la même ponte: un développement normal et un développement abortif. Les œufs qui donnent des embryons normaux émettent deux globules polaires, les œufs qui donnent des embryons anormaux n'émettent qu'un globule polaire. Ils ne sont pas fécondés mais commencent à se diviser et arrivent tardivement au stade 16—32 blastomères, puis la segmentation s'arrête. On suggère l'existence d'une parthénogénèse abortive. Les facteurs du déclenchement du processus du développement abortif sont discutés.

## Introduction

Les travaux de G. A. Schmidt (1932, 1934, 1964) ont montré que dans une même ponte de *Lineus ruber* un petit nombre d'œufs, 8 % environ (pour ceux de Roscoff), présentent un développement normal conduisant à des larves viables, le plus grand nombre des œufs émis, 92 % environ, présentant un développement abortif. D'autre part Schmidt (1934, 1964) a mis en évidence que les embryons qui se développent normalement avalent les embryons abortifs, aux différents stades du développement embryonnaire. Enfin M. Gontcharoff (1960) a montré que le développement post-embryonnaire et la survie des embryons normaux sont étroitement conditionnés par la consommation des embryons non développés.

Le présent travail est consacré à l'étude du mécanisme et des causes de l'arrêt du développement de certains embryons de *Lineus ruber*.

## Techniques et méthodes

Les *Lineus* récoltés à Roscoff sont élevés selon les techniques mises au point dans ce laboratoire (Gontcharoff, 1958, 1960). Ces méthodes d'élevage permettent d'obtenir des pontes ne différant en rien de celles récoltées à la même époque sur les plages de Roscoff.

### *Techniques histologiques*

Les œufs des Lineidae, relativement riches en vitellus, sont difficiles à inclure et à couper. Les techniques suivantes ont donné les meilleurs résultats.

Fixation au Bouin-Hollande: 36 heures.

Déshydratation en deux étapes: a) 15 h à l'alcool éthylique, 5 h alcool 70°, 5 h alcool 95°, 5 h alcool 100°. b) 12 h à l'alcool butylique tertiaire.

Inclusion: 24 heures dans quatre bains de paraffine.

La fixation des ovarioles entières se pratique après avoir fendu longitudinalement la ponte et prélevé ces ovarioles à la pipette. Sur les œufs isolés, on effectue la double inclusion à la gélose-paraffine selon Chatton (1936).

D'autre part, après fixation au Carnoy acétique, qui rend transparente l'enveloppe les entourant, on a monté des œufs isolés ou de jeunes embryons «in toto». Après montage au baume du Canada, un léger écrasement de la préparation facilite l'observation, la recherche des globules polaires et la détermination du nombre de blastomères.

### *Techniques cytophotométriques*

Le taux d'ADN des noyaux des embryons normaux et abortifs a été étudié sur des coupes de 10 à 15  $\mu$  suivant l'épaisseur des noyaux étudiés, de telle façon que le noyau soit toujours compris dans l'épaisseur de la coupe. Toutes les préparations, traitées de façon strictement identique, sont colorées par le mélange de Feulgen.

Les mesures cytophotométriques sont effectuées à l'aide de l'appareil Leitz MPE. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (extinction  $\times$  volume nucléaire). Les dimensions des noyaux sont déterminées sur les agrandissements photographiques des préparations.

Enfin on a procédé à l'isolement plus ou moins prolongé de femelles et à des fécondations artificielles. Ces techniques seront précisées dans le texte.

## Résultats

### *Développement des embryons abortifs*

Schmidt (1934) et Gontcharoff (1960) ont signalé que tous les œufs d'une même ponte commencent à se segmenter. Nos observations ont permis de préciser que, dans nos conditions expérimentales, dans les dix premières heures qui suivent la ponte, tous les embryons parviennent au stade de l'émission du premier globule polaire (fig. 1 et 2). Quelques œufs, en petit nombre, émettent un deuxième globule polaire, le plus grand nombre des œufs n'en émettant qu'un seul. Sur les montages «in toto» il est facile de repérer les œufs ayant expulsé les deux globules polaires et les œufs n'en ayant formé qu'un seul (fig. 3 et 4).

Au bout de 24 heures les œufs ayant expulsé les deux globules polaires sont au stade 16—32 blastomères, par contre les embryons n'ayant formé qu'un seul globule polaire sont à l'état quiescent, les 9 chromosomes (nombre haploïde) sont bien visibles au début, puis le noyau s'estompe et devient difficilement colorable.

Au deuxième jour après la ponte, les embryons normaux sont au stade 128 blastomères. La majorité des œufs, n'ayant toujours émis qu'un globule polaire, restent à l'état quiescent sans présenter de segmentation.

Au troisième jour, les embryons normaux sont au stade morula. Les œufs non segmentés présentent alors seulement, en leur centre, une division anormale multipolaire (fig. 5 et 6). A la suite de cette mitose anormale les noyaux s'individualisent, migrent à la périphérie de l'œuf et le cytoplasme se sépare en autant de blastomères qu'il y a de noyaux. La taille et la disposition des blastomères sont tout à fait irrégulières (fig. 7 et 8).

Au quatrième jour après la ponte, la gastrulation commence pour les embryons normaux. Les embryons abortifs arrêtent leur segmentation. Le dénombrement systématique des blastomères sur coupes sériées montre que la segmentation pour ces derniers s'arrête au stade 16—32 blastomères.

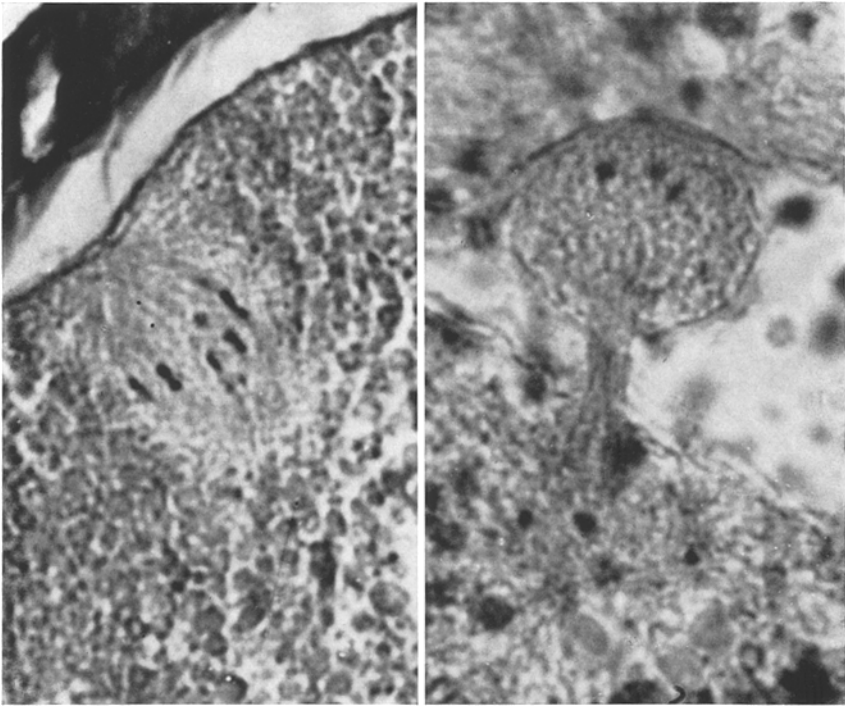


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 1. Fuseau de formation du premier globule polaire. (Fin de métaphase.) ( $\times 4500$ )

Fig. 2. Expulsion du premier globule polaire ( $\times 5500$ )

Ces premières observations montrent qu'au sein d'une même ponte, certains embryons émettent deux globules polaires, commencent et poursuivent une segmentation normale, arrivent au stade gastrula et poursuivent leur développement. D'autres n'émettent qu'un globule polaire et après mitose multipolaire arrêtent leur segmentation au stade 16—32 blastomères.

Ces observations permettent de poser la première question quant à la différence existant entre les deux types d'œufs observés: tous les œufs sont-ils fécondés?

En fait Gontcharoff (1951, 1960) a mis en évidence que, chez *Lineus ruber*, la ponte des femelles isolées depuis un mois est possible et que des spermatozoïdes peuvent être observés dans les voies génitales de celles-ci avant la ponte et dans les ovaires après la ponte. Ces faits suggèrent: 1. une survie assez longue des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles, 2. une fécondation interne précédant la ponte.

Trois séries de recherches ont donc été entreprises:

1. Isolement de femelles et étude des embryons provenant des pontes émises après isolement plus ou moins prolongé.
2. Fécondation artificielle.
3. Etude cytophotométrique des noyaux des deux types d'embryons.

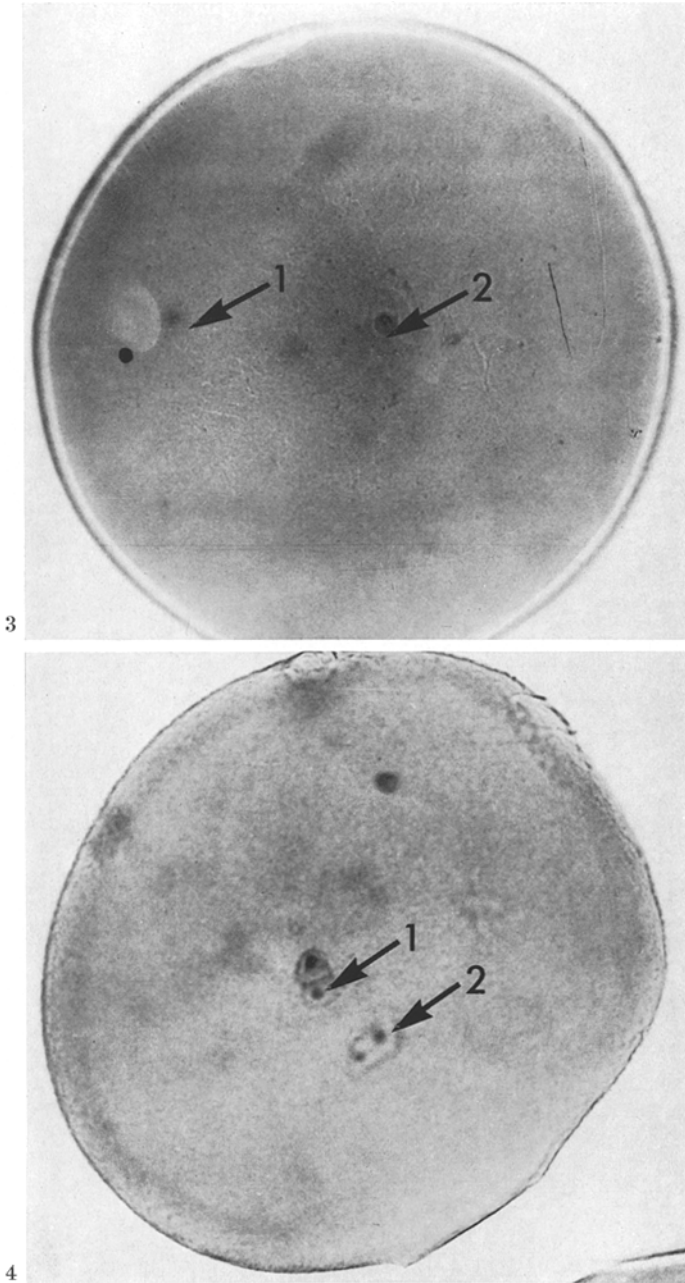


Fig. 3. Montage «in toto» d'un œuf qui n'a formé qu'un seul globule polaire (flèche No. 2).  
Le noyau est indiqué par la flèche No. 1 ( $\times 480$ )

Fig. 4. Montage «in toto» d'un œuf qui a formé 2 globules polaires (flèche No. 1). La première division du noyau est indiquée par la flèche No. 2 ( $\times 480$ )

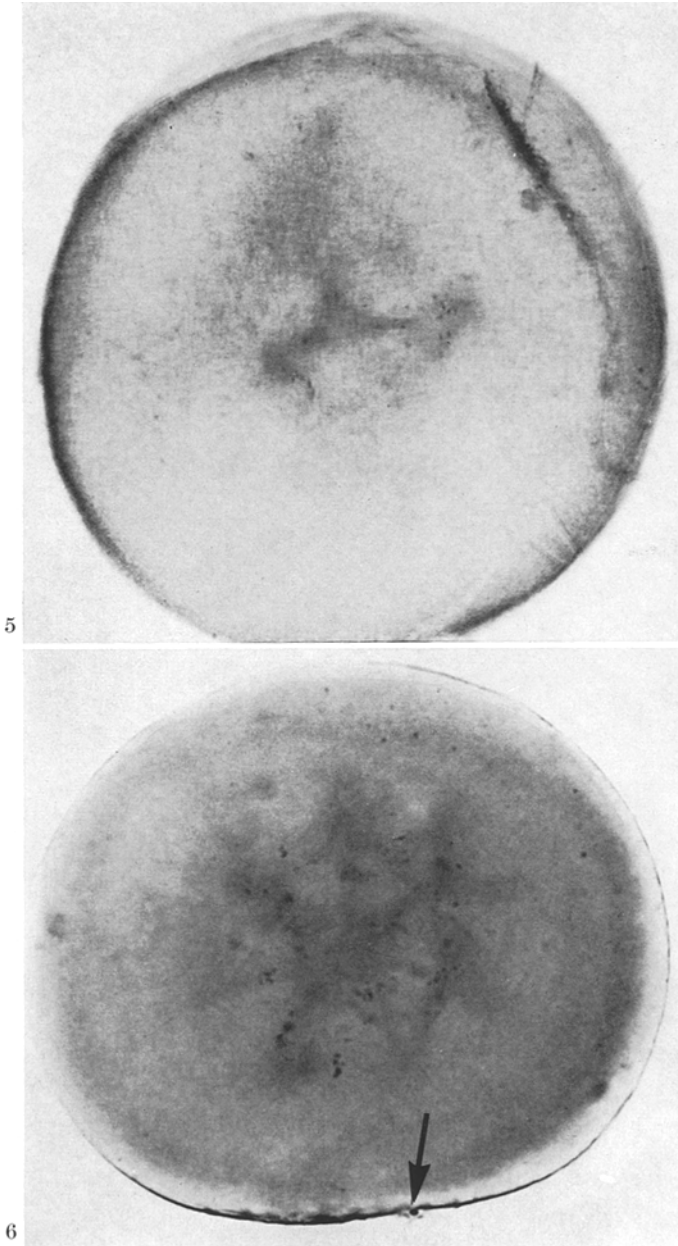
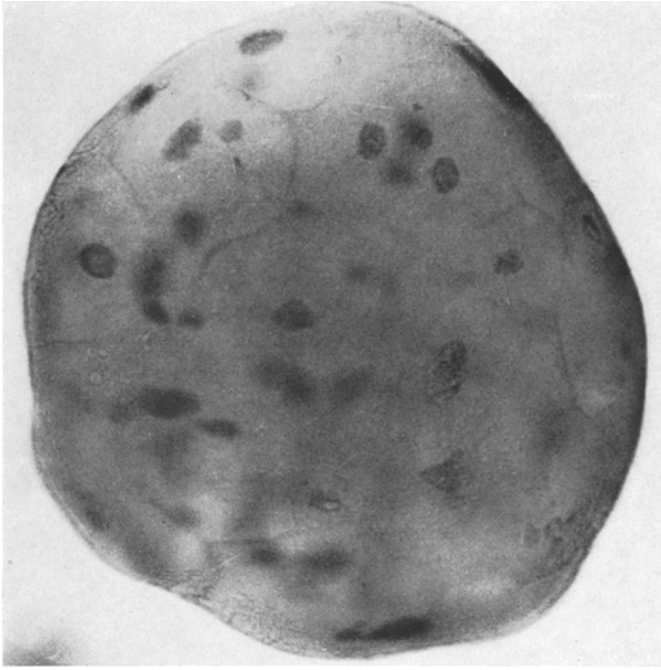


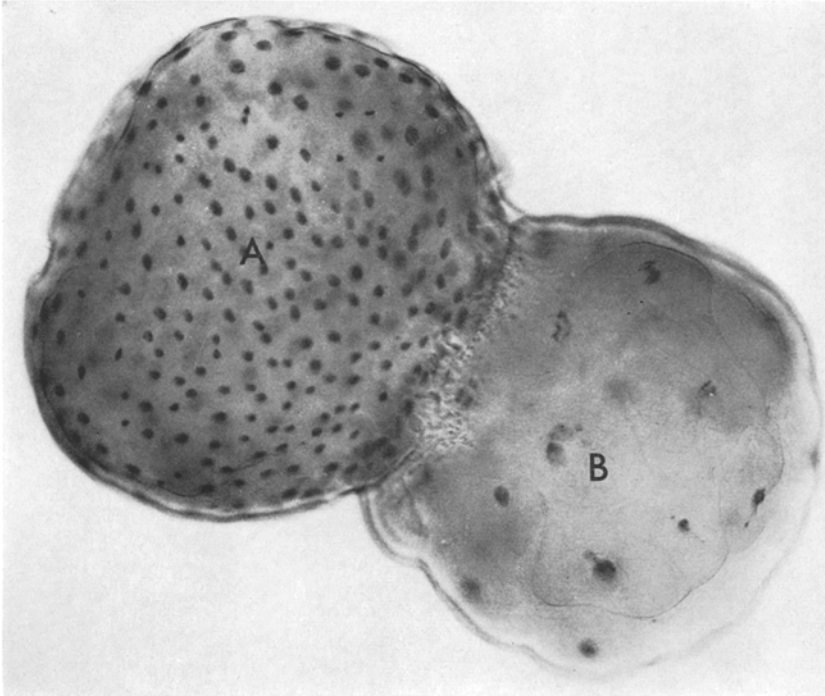
Fig. 5 et 6. Mitoses multipolaires au centre d'embryons abortifs. (Montage «in toto».) Sur la photo 6, la flèche indique un globule polaire ( $\times 500$  et  $\times 450$ )

#### 1. Isolement des femelles et étude des pontes émises par les femelles isolées

Les femelles sont isolées dans de l'eau de mer stérilisée. On les sépare en deux lots: *lot A* isolement de courte durée, de 1 à 36 jours avant la ponte; *lot B* isolement de longue durée, 7 à 12 mois avant la ponte.



7



8

Fig. 7. Embryon abortif en fin de segmentation. (Montage «in toto») ( $\times 500$ )

Fig. 8. Embryon normal (A) près d'un embryon abortif (B) ( $\times 380$ )

Le Tableau 1 rend compte des résultats: Sur 49 femelles isolées, 30 ont pondu: 21 appartenant au *lot A*, 9 appartenant au *lot B*.

Un développement embryonnaire normal est observé uniquement pour les œufs émis par les femelles du *lot A*, isolées peu de temps avant la ponte; on retrouve des spermatozoïdes dans leurs voies génitales. Les larves qui se développent représentent 8,1 % de l'ensemble des œufs émis, le même pourcentage que celui décrit par Schmidt (1938) pour les pontes de Roscoff.

Les femelles du *lot B*, isolées pendant 7 à 12 mois, pondent également. Les pontes sont d'aspect normal, les œufs commencent bien à se segmenter, mais la segmentation s'arrête à 16—32 blastomères: *tous les embryons sont abortifs*. On ne trouve pas de spermatozoïdes dans les voies génitales.

## 2. Fécondation artificielle des femelles isolées

Si par une section transversale on coupe la femelle en deux, la cicatrisation est assez rapide et les régions antérieure et postérieure séparées sont capables de pondre.

On établit deux lots: *lot 1* de 6 femelles isolées 10 jours au plus avant la ponte; *lot 2* de 5 femelles isolées un an avant la ponte.

Tableau 1. *Ponte des femelles isolées. Lot A = isolement de courte durée, Lot B = isolement de longue durée. Pourcentage d'embryons normaux et abortifs*

	Temps d'isolement des ♀	Nbre de ♀	Présence de spermatozoïdes dans les voies génitales	Nbre des embryons normaux	Nbre des embryons abortifs	Pourcentage des embryons qui se développent
<i>Lot A</i>	7 heures	1	+	6	70	7,9
	24 heures	1	+	10	118	7,8
	3 jours	1	+	9	89	9,2
	4 jours	2	+	16	216	6,9
			+	12	110	9,8
			+	11	132	7,7
			+	17	206	7,6
	5 jours	4	+	9	101	8,2
			+	7	73	8,7
			+	6	79	7
			+	11	130	7,8
	6 jours	1	+	14	150	8,5
	8 jours	1	+	12	136	8,1
	9 jours	2	+	11	144	7,1
	10 jours	1	+	9	112	7,4
	33 jours	3	+	13	149	8
			+	15	181	7,6
			—	0	tous	0
	36 jours	3	+	9	119	7
—			0	tous	0	
—			0	tous	0	
<i>Lot B</i>	7 mois	6	—	0	tous	0
	1 an	3	—	0	tous	0

On sectionne chaque femelle en deux. La partie antérieure est mise dans une saïère contenant de nombreux spermatozoïdes mûrs. La partie postérieure, dans les mêmes conditions, est mise dans de l'eau de mer stérilisée. Quatre femelles du *lot 1* et trois du *lot 2* ont pondu normalement. Le Tableau 2 rend compte des résultats et montre que 8,2 % en moyenne des embryons provenant des femelles isolées peu de temps avant la ponte, présentent un développement embryonnaire normal, que les œufs proviennent de la région antérieure inséminée ou de la région postérieure non inséminée: des spermatozoïdes étaient présents dans les voies génitales de la femelle avant son bref isolement.

Tableau 2. *Etude du développement embryonnaire sur femelles isolées et sectionnées en deux. Partie antérieure: fécondation artificielle. Partie postérieure: non fécondée, mise en eau de mer stérilisée*

	No. de la ♀		Durée d'isolement	Nbre des embryons normaux	Nbre des embryons abortifs	Pourcentage des embryons qui se développent
<i>Lot 1</i>	1	part. ant.	4 jours	6	75	7,4
		part. post.	4 jours	8	81	8,8
	2	part. ant.	7 jours	5	44	10,2
		part. post.	6 jours	13	158	7,6
	3	part. ant.	7 jours	7	83	7,7
		part. post.	6 jours	8	91	8
	4	part. ant.	10 jours	10	138	6,8
		part. post.	8 jours	6	70	7,8
<i>Lot 2</i>	5	part. ant.	1 an	12	147	7,5
		part. post.	1 an	0	tous	0
	6	part. ant.	1 an	8	74	9,7
		part. post.	1 an	0	tous	0
	7	part. ant.	1 an	8	86	8,5
		part. post.	1 an	0	tous	0

*Lot 1* = isolement de courte durée, *Lot 2* = isolement de longue durée.

Par contre pour les pontes provenant des femelles isolées depuis un an, seules les pontes émises par la partie antérieure inséminée présentent des embryons normaux (environ 8,3 %). Les embryons provenant de la partie postérieure de l'animal, non inséminée, présentent tous un développement abortif.

Ces deux séries d'expériences suggèrent que seuls les œufs fécondés conduisent à un développement embryonnaire normal.

### 3. Etude cytophotométrique des noyaux des deux types d'embryons

Une vérification supplémentaire semble concluante: en effet la mesure de la teneur en ADN des noyaux des embryons normaux et abortifs a été effectuée. Les résultats en sont consignés dans le Tableau 3. *La teneur en ADN des noyaux des embryons normaux est double de celle des embryons abortifs qui sont donc haploïdes.*



Tableau 3. *Taux de l'ADN en unités arbitraires (extinction  $\times$  volume nucléaire) dans les noyaux d'embryons normaux et d'embryons abortifs*

Nature des embryons	Stade du développement	Nombre de mesures	Age de la ponte	Teneur moyenne en ADN
Normal	16—32	10	1 jour	3 $\pm$ 0,16
Abortif	16—32	25	4 jours	1,4 $\pm$ 0,12
Abortif	16—32	20	5 jours	1,3 $\pm$ 0,18

L'ensemble de ces expériences montre que dans une ponte de *Lineus ruber*, comprenant environ 400 œufs, 8 % de ceux-ci sont fécondés et donnent des embryons au développement normal, 92 % ne sont pas fécondés et donnent des embryons abortifs.

### Discussion

Si l'on peut conclure que les deux types de développement embryonnaire normal et abortif correspondent respectivement à des œufs fécondés et non fécondés, il n'en reste pas moins vrai que tous commencent à se segmenter, présentant un cas de parthénogénèse abortive pour les œufs non fécondés.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées en ce qui concerne le facteur responsable de l'activation des œufs et des premiers stades de segmentation.

Tout d'abord l'étude cytochimique du gamète femelle aux différents stades de l'ovogénèse n'a pu, dans les limites des techniques utilisées, montrer aucune différence cytochimique entre les œufs qui donnent des embryons normaux et ceux donnant des embryons abortifs (Olivier, 1966).

Par contre l'étude de l'ultrastructure des spermatozoïdes de *Lineus ruber* (Girard, 1967), a permis de distinguer trois sortes de spermatozoïdes: au niveau de la pièce intermédiaire certains présentent trois mitochondries, d'autres quatre et quelques uns enfin cinq. Les spermatozoïdes à trois mitochondries, en petit nombre, représentent 8 % environ, ce qui est en accord avec le pourcentage d'œufs à développement normal. Il serait donc tentant d'attribuer à cette catégorie de spermatozoïdes le rôle fécondant et à d'autres le rôle d'activation sans amphimixie conduisant à un développement abortif. Mais cette hypothèse se heurte à de graves difficultés car on n'a pas pu séparer les différents types de spermatozoïdes et il n'y a pas de preuve directe. On pourrait envisager une fécondation interspécifique avec du sperme d'une espèce voisine *Lineus viridis*. Chez cette espèce les premières recherches ont montré que les femelles isolées pondent, mais que les œufs non fécondés ne se développent pas et ne se segmentent pas. Quand les œufs sont fécondés ils se développent tous et donnent des larves viables. Enfin, chez *Lineus viridis*, en majorité (90 %), les spermatozoïdes sont du type à trois mitochondries. Ce travail est en cours.

D'autre part, il nous faut envisager le cas des femelles isolées pendant un temps long dont tous les embryons sont abortifs mais chez lesquels on observe un début de segmentation en dehors de tout contact avec les spermatozoïdes. Il paraît donc actuellement plus vraisemblable de supposer que l'agent déclanchant le processus parthénogénétique pourrait être la modification de condition

physico-chimique du milieu se produisant au passage brutal des œufs du milieu interne à l'eau de mer.

Remarquons qu'aucune division n'est jamais observée avant la ponte bien que la fécondation soit interne.

L'étude cytologique des mitoses multipolaires chez les embryons abortifs est actuellement en cours. Les premières observations cytologiques et autoradiographiques (incorporation de thymidine <sup>3</sup>H) montrent des aberrations chromosomiques telles qu'il est facile de comprendre pourquoi après les premières divisions de segmentation, le développement embryonnaire avorte et ne peut se poursuivre.

### Références

- Chatton, E.: Inclusion mixte à la gélose et à la paraffine. Bull. Soc. franç. micr. 5, 26—39 (1936).
- Girard, M.: Etude des ultrastructures au cours de la différenciation du spermatozoïde chez *Lineus ruber* (O. F. Müller). Diplôme d'Etudes Supérieures. Fac. Sci. Reims, France, 1967.
- Gontcharoff, M.: Biologie de la régénération et de la reproduction chez quelques *lineidae* de France. Ann. Sci. Nat. Zool., 11. sér., 13 151—235 (1951).
- Rearing of certain nemerteans (genus *Lineus*), Ann. N.Y. Acad. Sci 77, 93—95 (1959).
- Le développement post-embryonnaire et la croissance chez *Lineus ruber* et *Lineus viridis* (Némertes, *lineidae*). Ann. Sci. Nat. Zool., 12. sér., 225—279 (1960).
- Olivier, J.: Le nucléole au cours de l'ovogénèse chez *Lineus ruber* (O. F. Müller). Diplôme d'Etudes Supérieures, Fac. Sci. Reims, France, 1963.
- Cytochimie de l'ovocyte au cours de la vitellogénèse chez *Lineus ruber*, Ann. Univ. Reims 4, 158—165 (1966).
- Schmidt, G. A.: Dimorphisme embryonnaire de *Lineus ruber* de la côte Mourmane et de Roscoff. Bull. Inst. Ocean. Monaco 595, 1—50 (1932).
- Ein zweiter Entwicklungstypus von *Lineus gesserensis ruber* (O. F. Müller) (Nemertini). Zool. Jb., Abt. Anat. u. Ontog. 58, 607—660 (1964).
- Jankovskaia, L. A.: Biologie de la reproduction de *Lineus gesserensis ruber* de Roscoff et du golfe de Kola. Arch. Zool. exp. gen. 79, 487—513 (1938).
- Embryonic development of littoral nemertines *Lineus desori* (Mihi species nova) and *Lineus ruber* (O. F. Müller, 1774, G. A. Schmidt, 1945) in connection with ecological changes of mature individuals when forming the new species *Lineus ruber*. Zool. Pol. 14 (1—2), 75—122 (1964).

Dr. Marie-Josèphe Alluchon-Gerard  
 Laboratoire de Biologie cellulaire  
 et Centre de Biologie du Développement  
 B. P. 347, Reims (51—Marne), France