

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DU NUCLEOLE DES CELLULES DE L'EPIDERME ASSOCIE A LA CUTICULE MINERALISEE DU CRABE VERT, *CARCINUS MAENAS*, AU COURS D'UN CYCLE DE MUE

A. THEISSEN *, Ph. COMPERE **, G. GOESSENS * et G. GOFFINET **

Ultrastructural nucleolar changes in the mineralized cuticle associated epidermal cells of the green crab, *Carcinus maenas*, during a moulting cycle.

Mots-clés : *Carcinus maenas*, nucléole, cycle de mue.

Key-words : *Carcinus maenas*, nucleolus, moult cycle.

Summary

Nuclear and nucleolar morphology generally reflects cellular activity. In the present work, we tried to establish relations between structure and function in a system presenting cyclic variations of activity, that is to say the integument of the crustacean *Carcinus maenas* during a complete moult cycle.

The results can be summarized as follow:

1. The nucleoli of the epidermal cells never show fibrillar centres and the argyrophilic proteins are located within a fibrillo-granular component.
2. The amount of dense fibrillar component and of perinucleolar chromatin seems to be a reliable indicator for nucleolar activity.
3. The various steps of the moult cycle characterized by structural features in the cuticle are always preceded by ultrastructural modifications in epidermal cells related to the elaboration and degradation of the exoskeleton.

Résumé

La morphologie du nucléole et du noyau en général étant liée à l'état fonctionnel de la cellule, nous avons tenté dans ce travail d'établir une relation entre la structure des cellules épidermiques, et en particulier des nucléoles, et l'évolution de la cuticule d'un crustacé décapode, *Carcinus maenas*, au cours d'un cycle de mue.

Nous avons pu montrer que les différentes étapes du cycle de mue, caractérisées par la structure cuticulaire, sont précédées de modifications ultrastructurales des cellules épidermiques traduisant de manière précise l'état fonctionnel de ces cellules impliquées d'une part dans la dégradation de l'ancienne cuticule et d'autre part dans l'élaboration de la nouvelle cuticule.

* Biologie cellulaire et tissulaire, Institut A. Swaen, Université de Liège, 20, rue de Pitteurs, B-4020 Liège (Belgique)

** Morphologie animale, Institut E. Van Beneden, 22, quai Van Beneden, B-4020 Liège (Belgique)

Présenté le 21 janvier 1988.

INTRODUCTION

Le nucléole est au sein de la cellule le site de production des ribosomes qui participent à l'élaboration des protéines. Il est fréquemment utilisé en tant que "témoin" de l'activité cellulaire. On comprend donc aisément l'intérêt que présente l'étude de cet "organite" nucléaire.

De nombreuses revues résument l'ensemble de nos connaissances sur le sujet. Parmi celles-ci, citons Busch et Smetana (1970), Jordan et Cullis (1982), Goessens (1984) et Fakan et Hernandez-Verdun (1986).

En théorie, un nucléole est composé d'un ou de plusieurs centres fibrillaires, de constituant fibrillaire dense, de constituant granulaire, de vacuoles nucléolaires et de chromatine dense associée.

Le centre fibrillaire est riche en protéines, notamment des protéines argyrophiles, mais on y trouve également un peu de DNA qui correspondrait aux gènes ribosomiques. La transcription de ceux-ci, à la surface du centre fibrillaire, est visualisée sous forme de constituant fibrillaire dense. Le constituant granulaire représente une étape de la maturation post-transcriptionnelle des pré-rRNA et correspond à des pré-ribosomes. Les vacuoles nucléolaires pourraient représenter selon certains auteurs (Moreno Diaz de la Espina et al., 1980; Deltour et De Barsy, 1985; Deltour et al., 1986) un lieu de stockage des pré-ribosomes maturés et augmenteraient la surface d'échange entre le nucléole et le nucléoplasme. Quant à la chromatine dense associée au nucléole, elle envoie des digitations qui entrent au contact des centres fibrillaires.

L'importance relative des différents constituants nucléolaires est variable et traduit souvent un état fonctionnel particulier. Ces modifications peuvent être provoquées par des agents physiques ou chimiques (revue dans Simard, 1970; Bouteille et al., 1982) ou observées dans certaines conditions physiologiques (Adamstone et Taylor, 1972, 1977, 1979; Karasek et al., 1972, 1973; Evans et al. 1978; Fakan et Deltour, 1981; Couve, 1985).

En fait, la taille et la morphologie du nucléole semblent bien dépendre directement de l'équilibre existant entre la synthèse et l'élimination des pré-rRNA (Studzinsky et al., 1972; Goessens, 1978; Kwiatkowska et Maszewski, 1985; Vasquez-Nin et al., 1986).

Le présent travail vise à mieux comprendre la relation existant entre l'ultrastructure du nucléole et l'état fonctionnel de la cellule. Dans cette optique, un modèle présentant des variations cycliques d'activité est particulièrement intéressant. Or, nous disposons d'un matériel répondant à ce critère et ayant fait l'objet d'études détaillées (Jeuniaux et al., 1986; Compère et Goffinet, 1987; Thorez et al., 1987). Il s'agit du tégument d'un crustacé décapode, *Carcinus maenas*, au cours d'un cycle de mue. Classiquement, la cuticule minéralisée des Crustacés décapodes se compose de quatre couches: l'épicuticule surmontant dans l'ordre la couche pigmentaire, la couche principale et la couche membraneuse. Au cours de la mue, la cuticule est progressivement et partiellement résorbée du côté interne (phase préecdysiale, stades D0, D2) et abandonnée au moment de l'exuviation (ecdysis, stade E) au profit d'une nouvelle cuticule dont les premières couches sont synthétisées dès le stade D2 et qui sera achevée au cours de la phase post-ecdysiale (Stades A2, C3). La phase suivante, dite également de repos tégumentaire, est l'intermue (stade C4). La mue, phénomène cyclique, permet entre autres à la carapace de "suivre" la croissance tissulaire continue de l'organisme.

Nous avons donc tenté d'établir une relation entre l'évolution de la cuticule de *Carcinus maenas* et l'ultrastructure des nucléoles des cellules de l'épiderme du feuillet externe des lames branchiostèges. En effet, ce sont les cellules épidermiques qui sont responsables de la dégradation et de la résorption de l'ancienne cuticule ainsi que de la synthèse de la nouvelle cuticule.

MATERIEL ET METHODES

Des crabes *Carcinus maenas* (L) ont été prélevés en période de mue (septembre, avril) à la Station de Biologie marine de Wimereux (France). La détermination des stades de mue a été faite selon la méthode décrite par Drach (1939) et Drach et Tchernigovtzeff (1967). Les lames branchiostèges ont été prélevées par dissection et débitées en fines languettes.

Des fragments ont été fixés successivement dans une solution de glutaraldéhyde 2,5% (pendant 3 h. et à 20° C) et d'acide osmique (pendant 2 h. à 4° C) tamponnée par du cacodylate de sodium 0,1M à pH 7,4 dont l'osmolarité avait été ajustée à 520 milliosmoles par addition de sucrose. Après déshydratation, les fragments ont été inclus dans de l'Epon 812.

Les protéines argyrophiles ont été mises en évidence par une imprégnation à l'argent selon Ploton et al. (1982) en allongeant les temps de fixation (glutaraldéhyde 1,6% pendant 30 min. et liquide de Carnoy pendant 10 min.) suivie d'une acétylation selon Wassef et al. (1979).

Des coupes ultra-fines de 600 à 800 Å ont été réalisées à l'aide d'un couteau de diamant monté sur un ultramicrotome à avance thermique Reichert OMU-3, recueillies sur grilles de cuivre, contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb selon Reynolds (1963) pendant 15 min. et examinées au microscope électronique Philips EM 201.

RESULTATS

Identification des divers constituants nucléolaires

Le nucléole des cellules ectodermiques de *Carcinus maenas* se réduit à une masse centrale fibrillo-granulaire entourée d'une couronne parfois très mince de granules. L'imprégnation à l'argent selon Ploton et al. (1982) nous indique que c'est la partie centrale qui contient les protéines argyrophiles. La masse fibrillo-granulaire représente donc le pendant du constituant fibrillaire classique.

De plus, lorsqu'elle est visible, la chromatine dense périnucléolaire est toujours séparée du constituant granulaire par un espace peu dense aux électrons que nous appellerons espace périnucléolaire.

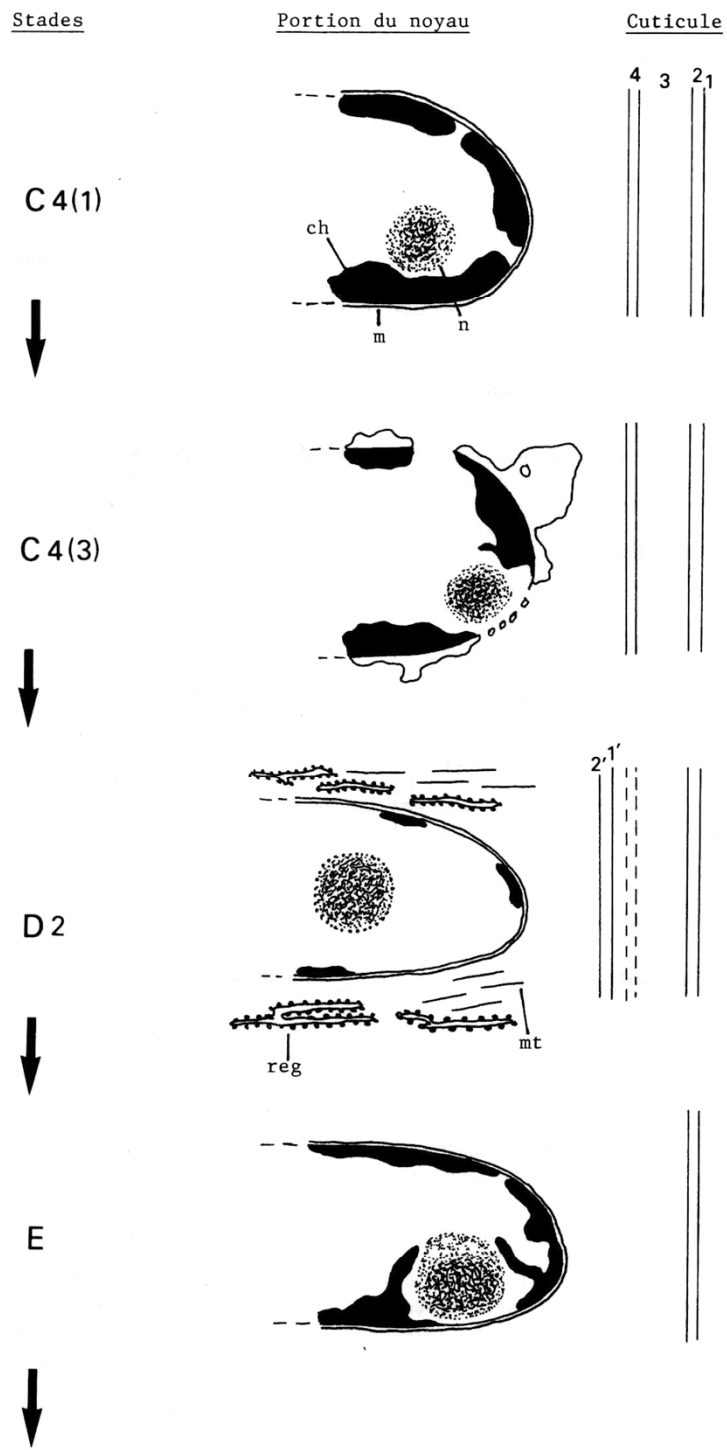
Modifications ultrastructurales de l'épiderme au cours d'un cycle de mue

Au stade C4, alors que la cuticule est complète, le noyau des cellules épidermiques sous-jacentes présente les caractéristiques suivantes. Le nucléole est de petite taille et est essentiellement composé de granules. La chromatine dense, disposée en gros amas contre la membrane nucléaire, est abondante et entoure partiellement le nucléole. A la fin du stade C4, on observe des dilatations de la citerne périnucléolaire ainsi que de nombreux complexes de pores au voisinage du nucléole. L'enveloppe nucléaire reprend toutefois un aspect habituel dès le stade D0.

Au stade D2, alors que se réalisent la synthèse des premières couches de la nouvelle cuticule et la dégradation partielle de l'ancienne, le nucléole est plus volumineux, situé au centre du noyau et surtout composé de fibrilles. La chromatine dense est réduite et la chromatine périnucléolaire est absente. Le réticulum endoplasmique granulaire et le système microtubulaire sont très développés.

Au stade E, la chromatine dense, notamment la chromatine périnucléolaire, refait son apparition. Le nucléole est à nouveau proche de l'enveloppe nucléaire. On note une réduction du constituant fibrillaire et un accroissement du constituant granulaire qui apparaît criblé de vacuoles.

Au stade C3, alors qu'il y a synthèse de la couche membraneuse, la chroma-

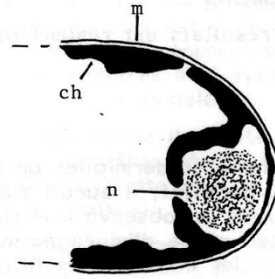


Stades

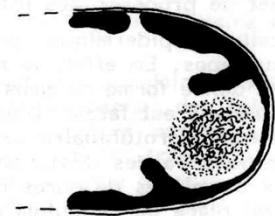
Portion du noyau

Cuticule

A2



C3



C4

Planche n°1

ch: chromatine - m: enveloppe nucléaire

mt: microtubules - n: nucléole

reg: réticulum endoplasmique granulaire

1: épicuticule - 1': nouvelle épicuticule

2: couche pigmentaire - 2': nouvelle couche pigmentaire

3: couche principale - 3': nouvelle couche principale

4: couche membraneuse - 4': nouvelle couche membraneuse

-----: couche dégradée

tine périnucléolaire se redécondense légèrement tandis que le volume du nucléole subit un léger accroissement.

L'ensemble de ces résultats est résumé dans la planche n°1.

DISCUSSION

Le nucléole des cellules épidermiques de Carcinus maenas présente un aspect quelque peu particulier. En effet, à aucun stade du cycle de mue on ne distingue de centres fibrillaires, mais on observe une masse centrale fibrillo-granulaire. Après utilisation de la technique d'imprégnation à l'argent, connue pour mettre sélectivement en évidence les constituants fibrillaires du nucléole, on constate que cette masse centrale fibrillo-granulaire est fortement argyrophile. On peut donc l'assimiler au constituant fibrillaire classique. Puisqu'il est généralement admis que l'importance du constituant fibrillaire dense est un bon reflet de l'activité transcriptionnelle, l'étude du comportement de ce constituant nucléolaire au cours du cycle de mue nous permet de proposer des interprétations d'ordre fonctionnel.

Au stade C4, les cellules épidermiques présentent au départ toutes les caractéristiques de cellules au repos. En effet, le nucléole est petit et essentiellement granulaire; la chromatine dense forme de gros amas. Ceci semble donc indiquer que l'activité transcriptionnelle est faible. D'autre part, le réticulum endoplasmique granulaire et le système microtubulaire sont réduits. Cependant, au cours de stades C4 ultérieurs, on observe des dilatations de l'enveloppe nucléaire ainsi que la présence de nombreux complexes de pores nucléaires qui correspondraient respectivement à une mise en place de réticulum endoplasmique granulaire et à un largage de pré-ribosomes. On sait en effet que l'enveloppe nucléaire peut être à l'origine de réticulum endoplasmique granulaire par l'intermédiaire de lamelles annelées (Kessel, 1968). De plus, le nombre de pores nucléaires augmente lors de la reprise de l'activité transcriptionnelle au cours de la germination de Zea mays (Crèvecoeur et al., 1982).

Ces modifications représentent très probablement les premières manifestations au niveau épidermique de l'entrée en mue de l'organisme alors qu'aucun changement n'est encore décelable au niveau de la cuticule. Par conséquent, nous pensons pouvoir diviser le stade C4 en sous-stades: le stade de repos tégumentaire (C4₁) et deux stades ultérieurs (C4₂ et C4₃) où apparaissent respectivement les dilatations de la citerne périnucléaire puis les interruptions de l'enveloppe nucléaire et les complexes de pores au voisinage du nucléole. Ces deux derniers stades témoignent d'une intense activité cellulaire nécessaire au déclenchement de la mue. Un stade intermédiaire C4-D0 a déjà été défini par Andrieux (1979) lors d'une étude sur Carcinus maenas et Carcinus mediterraneus. Ce travail avait permis de déceler un asynchronisme de l'apolyse des épipodites des trois paires de maxillipèdes. A ce niveau, l'apolyse est observée successivement au niveau des trois appendices et est antérieure au stade D0. Ces résultats sont donc basés sur une étude des caractères morphologiques externes. Notre travail montre que l'étude de l'ultrastructure cellulaire et plus précisément nucléaire apporte des résultats convergents à savoir la mise en évidence d'au moins un stade de mue précoce antérieur au stade D0.

Par ailleurs, alors que l'on observe les premiers changements au niveau de la cuticule, l'aspect général des cellules épidermiques se modifie. La chromatine se décondense progressivement, la chromatine périnucléolaire disparaît, le nucléole devient plus volumineux, principalement à cause d'un accroissement du composant fibrillaire dense, et migre vers le centre du noyau. Le système microtubulaire et le réticulum endoplasmique granulaire sont très développés. Tous ces signes témoignent d'une intense activité de synthèse dont on peut par ailleurs voir les effets au niveau de la cuticule: dégradation de la couche membraneuse et d'une bonne partie de la couche principale ainsi que la synthèse d'une nouvelle épicuticule et de la couche pigmentaire.

Après l'exuviation (stade E) jusqu'au stade C1, l'activité des cellules épidermiques semble décroître progressivement et tous les phénomènes observés en phase pré-ecdysiale se déroulent en sens inverse. Or c'est à ce moment qu'est synthétisée la couche principale. Il faut donc admettre, comme l'a déjà signalé Stevenson (1972) que la majeure partie des RNA nécessaires à la synthèse de la couche principale est élaborée au cours de la phase pré-ecdysiale.

Au stade C3, on note une légère reprise de l'activité cellulaire se traduisant par une décondensation partielle de la chromatine périnucléolaire et un léger accroissement du constituant fibrillaire dense. Cette reprise d'activité pourrait être liée à la mise en place de la couche membraneuse.

En conclusion, il existe au cours du cycle de mue une relation directe entre l'ultrastructure des cellules épidermiques, notamment des nucléoles, et l'évolution de la structure de la cuticule. Toutefois, les signes d'activité observés au niveau de l'épiderme précèdent toujours les modifications de la cuticule.

D'autre part, la quantité de chromatine périnucléolaire et le développement du composant fibrillaire semblent bien constituer des critères morphologiques variables renseignant non seulement sur l'activité nucléolaire mais également sur l'activité cellulaire en général.

Enfin, l'utilisation de ces paramètres nucléolaires nous fournit dans le cas particulier du crustacé décapode Carcinus maenas des résultats qui confirment ceux obtenus par l'examen des seuls caractères morphologiques au niveau cuticulaire. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence trois pics d'activité nucléolaire correspondant à trois étapes précises du cycle de mue. Le pic principal représente l'activation de l'épiderme pour la mise en place de la nouvelle cuticule. Il se situe au stade D2. Il est précédé (au stade C4₃) et suivi (au stade C3) d'un pic plus petit correspondant probablement à l'élaboration du matériel nécessaire (hydrolases) à la dégradation de l'ancienne cuticule d'une part et à la biosynthèse des matériaux chitino-protéiques de la couche membraneuse de la nouvelle cuticule d'autre part.

Remerciements

Les auteurs remercient Mme A.M. Greimers pour son assistance technique ainsi que le Fonds National de la Recherche Scientifique pour son soutien financier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMSTONE F.B. and A.B. TAYLOR, 1972. Nucleolar reorganization in epithelial cells of jejunum of the rat. *J. Morph.*, **136**, 131-152.
- ADAMSTONE F.B. and A.B. TAYLOR, 1977. Nucleolar reorganization in cells of the kidney of the rat and its relation to aging. *J. Morph.*, **154**, 459-478.
- ADAMSTONE F.B. and A.B. TAYLOR, 1979. Nucleolar reorganization in liver cells of the aging rat. *J. Morph.*, **161**, 211-220.
- ANDRIEUX N., 1979. L'apolyse au cours du cycle d'intermue de deux Crustacés décapodes Brachyours, Carcinus maenas Linné et Carcinus méditerranéus Czerniavsky. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **288**, 1595-1597.
- BOUTEILLE M., D. HERNANDEZ-VERDUN, A.M. DUPUY-COIN and C.A. BOURGEOIS, 1982. Nucleoli and nucleolar-related structures in normal, infected and drug-treated cells. In: "The nucleolus" (eds. JORDAN E. and C. CULLIS) Cambridge University Press, London and New-York, **15**, 179-211.
- BUSCH H. and K. SMETANA, 1970. "The Nucleolus", Academic Press, New-York.
- COMPÈRE Ph. and G. GOFFINET, 1987. Elaboration and ultrastructural changes of the pore canal system in the mineralized cuticle of Carcinus maenas during the molting cycle. *Tiss. Cell*, **19**, 859-875.
- COUVE E., 1985. Morphometric analysis of the nucleolus during the life cycle of human odontoblasts. *Anat. Rec.*, **213**, 215-224.
- CREVECOEUR M., R. DELTOUR and R. BRONCHART, 1982. Quantitative freeze-fracture

- study of plasmalemma and nuclear envelope of *Zea mays* root cells during early germination. *J. Ultrastruct. Res.*, **80**, 1-11.
- DELTOUR R. and T. DE BARSY, 1985. Nucleolar activation and vacuolation in embryo radicle cells during early germination. *J. Cell Sci.*, **76**, 67-83.
- DELTOUR R., H. MOSEN and R. BRONCHART, 1986. Three-dimensional electron microscopy of the internal nucleolus-associated chromatin and of the nucleolar vacuoles during early germination of *Sinapis alba*. *J. Cell Sci.*, **82**, 53-71.
- DRACH P., 1939. Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés décapodes. *Ann. Inst. Océanogr. Monaco*, **19**, 103-392.
- DRACH P. and C. TCHERNIGOVITZEFF, 1967. Sur la méthode de la détermination des stades d'intermue et son application générale aux Crustacés. *Vie et Milieu, Sér. A, Biol. Marine*, **18**, 595-610.
- EVANS C.H., P. VAN GANSEN and I. RASSON, 1978. Transcription in early and late passage embryonic mouse fibroblasts in primary culture: a correlated biochemical, autoradiographical and ultrastructural study. *Biol. Cell*, **33**, 117-128.
- FAKAN S. and R. DELTOUR, 1981. Ultrastructural visualization of nucleolar organizer activity during early germination of *Zea mays* (L). *Exp. Cell Res.*, **135**, 277-282.
- FAKAN S. and D. HERNANDEZ-VERDUN, 1986. The nucleolus and nucleolar organizer regions. *Biol. Cell*, **56**, 189-206.
- GOESSENS G., 1978. Nucleolar ultrastructure during reversible inhibition of RNA synthesis in chick fibroblasts cultivated in vitro. *J. Ultrastruct. Res.*, **65**, 83-89.
- GOESSENS G., 1984. Nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol.*, **87**, 107-158.
- JEUNIAUX Ch., Ph. COMPERE et G. GOFFINET, 1986. Structure, synthèse et dégradation des chitinoprotéines de la cuticule des Crustacés décapodes. *Boll. Zool.*, **53**, 183-196.
- JORDAN E. and C. CULLIS, 1982. "The nucleolus", Cambridge University Press, London and New-York.
- KARASEK J., K. SMETANA, A. HRDLIKA, I. DUBININ, O. HORNAK and W. OEHLERT, 1972. Nuclear and nucleolar ultrastructure during late stages of normal human keratinocyte maturation. *Br. J. Derm.*, **86**, 601-607.
- KARASEK J., A. HRDLIKA and K. SMETANA, 1973. Studies on the nuclear and nucleolar ultrastructure in differentiating and differentiated human sebaceous cells. *J. Ultrastruct. Res.*, **42**, 234-243.
- KESSEL R.G., 1968. Annulate lamellae. *J. Ultrastruct. Res.*, suppl. 10, 1-82.
- KWIATKOWSKA M. and J. MASZEWSKI, 1985. Functional and structural heterogeneity of nucleoli-the dependence of the activity of transport of newly synthesized rRNA on nucleolar size and phase of the cell cycle. *Folia Histochem. Cytobiol.*, **23**, 117-126.
- KWIATKOWSKA M. and J. MASZEWSKI, 1985. Changes in the activity of transport of newly synthesized RNA from nucleus and nucleolus into cytoplasm during interphase. *Folia Histochem. Cytobiol.*, **23**, 127-134.
- KWIATKOWSKA M. and J. MASZEWSKI, 1985. Nucleolar size and the activity of rRNA transport in the course of morphogenetic reduction of cell dimensions. *Folia Histochem. Cytobiol.*, **23**, 135-144.
- MORENO-DIAZ de la ESPINA S., F. MEDINA and M. RISUENO, 1980. Correlation of nucleolar activity and nucleolar vacuolation in plant cells. *Europ. J. Cell Biol.*, **22**, 724-729.
- PLOTON D., H. BOBICHON and J.J. ADNET, 1982. Ultrastructural localization of NOR in nucleoli of human breast cancer tissues using a one-step Ag-NOR staining method. *Biol. Cell*, **43**, 229-232.
- REYNOLDS E., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**, 208-212.
- SIMARD R., 1970. The nucleus: action of chemical and physical agents. *Int. Rev. Cytol.*, **28**, 169-211.
- STEVENSON J.R., 1972. Changing activities of the crustacean epidermis during molt cycle. *Am. Zool.*, **12**, 373-380.
- STUDZINSKI G.P. and J.F. GIERTHY, 1972. Cytologic appearance of the nucleolus of normal and neoplastic cells in relation to the synthesis of RNA. *Acta Cytol.*, **16**, 245-248.

- THOREZ A., Ph. COMPERE et G. GOFFINET, 1987. Modifications ultrastructurales de la couche membraneuse de *Carcinus maenas* au cours de la période préecdysiale. Annls. Soc. R. Zool. Belg., 117, 122-123.
- VASQUEZ NIN G.H., O.M. ECHEVERRIA, G. ZAVALA, L.F. JIMENEZ-GARCIA, M.A. GONZALEZ and R. PARRA, 1986. Relations between nucleolar morphometric parameters and pre-rRNA synthesis in animal and plant cells. Acta Anat., 126, 141-146.
- WASSEF M., J. BURGLEN and W. BERNHARD, 1979. A new method for visualization of preribosomal granules in the nucleolus after acetylation. Biol. Cell, 34, 153-158.