

50376
1973
197

50376
1973
197

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

Laboratoire de Biologie animale

THESE DE 3^e CYCLE
(Biologie Cellulaire)

MAUFROID Jean-Pierre

LOCALISATION ET MIGRATION DES CELLULES GERMINALES PRIMORDIALES
CHEZ L'AMPHIBIEN URODELE PLEURODELES WALTLII MICHAH.



Présentée en Décembre 1973
devant la commission d'examen

Jury d'examen : M. DURCHON Président
 A. BART Rapporteur
 A. CAPURON Examineur

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

Laboratoire de Biologie animale

THESE DE 3^e CYCLE
(Biologie Cellulaire)

MAUFROID Jean-Pierre

LOCALISATION ET MIGRATION DES CELLULES GERMINALES PRIMORDIALES
CHEZ L'AMPHIBIEN URODELE PLEURODELES WALTLII MICHAH.

Présentée en Décembre 1973
devant la commission d'examen

Jury d'examen : M. DURCHON Président
 A. BART Rapporteur
 A. CAPURON Examineur

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	p. 1
MATERIEL ET METHODES.....	p. 4
I - ESPECE UTILISEE.....	p. 4
II - TECHNIQUES OPERATOIRES.....	p. 4
A - ABLATIONS ET TRANSPLANTATIONS.....	p. 5
B - CULTURE <u>IN VITRO</u>	p. 5
C - IMPLANTATION DANS LE BLASTOCELE.....	p. 6
III - TECHNIQUES D'OBSERVATION DES RESULTATS.....	p. 6
IV - APPRECIATION DES RESULTATS.....	p. 6

CHAPITRE I

REPARTITION ET MIGRATION DES C.G.P. PENDANT LA NEURULATION ET LES STADES DU BOURGEON CAUDAL	p. 8
I - ETUDE DES ANIMAUX TEMOINS.....	p. 9
A - LOCALISATION DES C.G.P.....	p. 9
B - REPARTITION DES C.G.P.....	p. 10
C - DISCUSSION.....	p. 10
II - ETUDE EXPERIMENTALE.....	p. 10
A - AU COURS DE LA NEURULATION.....	p. 10
1 - Ablations.....	p. 11
a) Jeune neurula (st. 15).....	p. 11
b) Neurula moyenne (st. 17).....	p. 12
c) Neurula âgée (st. 19-20).....	p. 12
2 - Culture <u>in vitro</u>	p. 13
a) Protocole opératoire.....	p. 13
b) Résultats.....	p. 14
- Aspect macroscopique.....	p. 14
- Aspect microscopique.....	p. 14
B - AUX STADES DU BOURGEON CAUDAL.....	p. 16
1 - Ablations.....	p. 16

a) Très jeune bourgeon caudal (st. 21).....	p. 17
- Ablation ventrale (type B).....	p. 17
- Ablation latérale (type D).....	p. 17
b) Jeune bourgeon caudal (st. 22).....	p. 17
- Ablation latérale (type D).....	p. 17
- Ablation d'ecto-mésoderme intermédiaire (type F).....	p. 18
- Ablation d'ecto-mésoderme intermédiaire (type G).....	p. 18
c) Bourgeon caudal moyen (st. 23 et 24).....	p. 18
- Ablation de l'ecto-mésoderme intermédiaire (type E).....	p. 18
d) Bourgeon caudal âgé (st. 25, 26 et 27).....	p. 19
2 - Culture <u>in vitro</u>	p. 19
a) Protocole opératoire.....	p. 19
b) Résultats.....	p. 19
- Stade 21.....	p. 19
- Stade 22.....	p. 21
- Stade 24.....	p. 22
- Stade 26.....	p. 24

CHAPITRE II

LOCALISATION DES C.G.P. AU COURS DE LA GASTRULATION	p. 26
I - EXPLANTATION <u>IN VITRO</u>	p. 27
A - CULTURE <u>IN VITRO</u> GLOBALE.....	p. 27
1 - Protocole opératoire.....	p. 27
2 - Résultats.....	p. 28
a) Aspect macroscopique.....	p. 28
b) Aspect microscopique.....	p. 28
B - CULTURE EN SANDWICH.....	p. 30
1 - Protocole opératoire.....	p. 30
2 - Résultats.....	p. 30
a) Culture sans endoblaste.....	p. 31
b) Culture avec endoblaste.....	p. 31
C - DISCUSSION	
II - EXPLANTATION <u>IN VIVO</u> : IMPLANTATION DANS LE BLASTOCELE.....	p. 33
A - PROTOCOLE OPERATOIRE.....	p. 33

B - RESULTATS.....	p. 33
--------------------	-------

CHAPITRE III

ETUDE PRELIMINAIRE SUR LES CONDITIONS DE DETERMINATION DES C.G.P. AUX STADES GASTRULA ET NEURULA	p. 36
---	-------

I - PROTOCOLE OPERATOIRE.....	p. 38
-------------------------------	-------

II - RESULTATS.....	p. 39
---------------------	-------

A - TRANSPLANTATION DE TERRITOIRE ECTO-MESODERMIQUE DE NEURULA.....	p. 39
--	-------

B - TRANSPLANTATION DE TERRITOIRE MESODERMIQUE DE GASTRULA..	p. 40
--	-------

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	p. 42
--	-------

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

De nombreuses espèces d'Amphibiens ont contribué aux recherches sur la lignée germinale. BOUNOURE (1934) fut le premier à montrer chez Rana temporaria que la détermination précoce des cellules germinales est sous la dépendance de matériaux cytoplasmiques, colorables spécifiquement. Selon BOUNOURE (1934) ce matériel particulier, qu'il dénomma "plasme germinal", se situe initialement au voisinage de la région corticale du pôle végétatif de l'oeuf fécondé, se ségrège progressivement au cours de la segmentation pour se restreindre à quelques cellules localisées dans le plancher du blastocèle. Ultérieurement ces cellules appelées cellules germinales primordiales (c.g.p.) migrent de l'endoderme vers leur position définitive dans les crêtes génitales.

Ce n'est qu'une vingtaine d'années plus tard que l'existence d'un tel plasme germinal fut étendue à d'autres espèces d'Anoures : Rana esculenta et Bufo bufo (BLACKLER, 1958), Rana pipiens (DI BERARDINO, 1961 ; MAHOWALD et HENNEN, 1971), Xenopus laevis (NIEUWKOOP et FABER, 1956 ; BLACKLER, 1958 ; CZOŁOWSKA, 1969 ; WILLIAMS et SMITH, 1971), Discoglossus pictus (GIPOULOUX, 1962a), Phrynobatrachus natalensis (BALINSKY, 1966).

Le rôle déterminant joué par le plasme germinal dans la différenciation de la lignée germinale fut avancé par BOUNOURE (1939), BOUNOURE, AUBRY et HUCK (1954) : en irradiant le pôle végétatif d'oeufs fécondés de R. temporaria avec la lumière ultraviolette, on détruit le plasme germinal et on réduit ainsi le nombre de cellules germinales formées aux stades ultérieurs. Des expériences du même ordre (PADOA, 1963 ; LIBRERA, 1964 ; SMITH, 1966) ont abouti à des résultats analogues.

Cette notion de continuité semble se confirmer par des observations à l'échelle ultrastructurale ; MAHOWALD et HENNEN (1971) chez R. pipiens et KALT (1973) chez Xenopus laevis ont pu établir des relations de similitude entre certaines structures cytoplasmiques du plasme germinal et des cellules sexuelles des crêtes génitales.

L'ensemble des travaux précédemment cités et plus spécialement ceux de BLACKLER et FISCHBERG (1961), LIBRERA (1964) et GIPOULOUX (1962 a, 1962 b) démontrent clairement que les c.g.p. des Anoures sont d'origine endodermique et constituent les cellules mères des gamètes.

Chez les Urodèles par contre la lignée germinale n'a fait l'objet que de recherches très fragmentaires.

Les premiers travaux réalisés sont l'oeuvre d'HUMPHREY (1925) chez Hemidactylium et Ambystoma maculatum ; cet auteur relève la présence des c.g.p., au moyen de méthodes uniquement descriptives, dans le mésoderme des lames latérales au stade du bourgeon caudal (st. 25 de la table de HARRISON).

HUMPHREY (1927, 1928), à la suite d'ablations et de transplantations vérifie la présence effective des c.g.p. dans le mésoderme intermédiaire de Ambystoma maculatum et Ambystoma jeffersonianum ; ces expériences sont réalisées à des stades relativement avancés du développement (st. 32 à 36 de la table de HARRISON). D'autres travaux purement descriptifs permettront à NIEUWKOOP (1964) chez Triturus taeniatus et à STARK (1955) chez 3 espèces de Triturus de mettre en évidence ces c.g.p. mais toujours à des stades larvaires. Aux stades plus précoces, la richesse de tous les tissus en granules vitellins ne permet plus de les distinguer des autres cellules embryonnaires. La difficulté majeure provient donc du fait que les c.g.p. ne peuvent être identifiées qu'après leur mise en place dans les crêtes génitales, c'est-à-dire à un stade relativement avancé du développement. Seules des méthodes expérimentales pouvaient permettre de localiser ces cellules à des stades plus précoces.

Des ablations et des transferts de territoires entre espèces différentes (Triturus alpestris, T. cristatus et Ambystoma mexicanum) ont permis à NIEUWKOOP (1946) de situer les c.g.p. au niveau du territoire présumé des lames latérales de la neurula et de la gastrula moyenne. Ces résultats ont été confirmés chez Ambystoma mexicanum par SMITH (1964) grâce à des échanges de mésoderme latéral présumé entre gastrulas moyennes appartenant aux génotypes noir et blanc ; ce marquage génétique permettait en outre à l'auteur de démontrer que les c.g.p. étaient à l'origine des futurs gamètes. Curieusement, il apparaît que les c.g.p. des Urodèles ont une origine totalement différente de celles des Anoures et des Amniotes : elles se forment non pas à partir de l'endoderme mais de cellules localisées dans le mésoderme latéral. Autre originalité des Urodèles, jusqu'à ces dernières années la présence d'un plasme germinal n'avait jamais été signalée, WILLIAMS et SMITH (1971) ont été les premiers à mentionner l'existence d'un tel plasme chez Ambystoma mexicanum. Ces particularités nous ont incité à entreprendre une étude approfondie de la lignée germinale chez un Amphibien Urodèle, Pleurodeles waltlii, chez lequel peu de travaux ont été réalisés en ce domaine. Signalons l'étude descriptive de HOUILLON (1956) sur des stades avancés et l'étude expérimentale de CAFURON (1967) qui a montré que l'extirpation du mésoderme intermédiaire d'un bourgeon caudal âgé entraînait une

stérilisation presque complète des embryons opérés.

Nous basant sur cette observation nous avons cherché à localiser les c.g.p. du Pleurodèle en procédant à de nombreuses ablations à divers stades du bourgeon caudal et de la neurulation. Parallèlement des territoires variés de ces mêmes stades ont été cultivés in vitro pour vérifier de manière positive la présence de ces cellules. La synthèse des résultats obtenus dans cette première partie nous a permis de tracer les voies de migration des c.g.p. vers les futures crêtes génitales.

La seconde partie a trait à la période de la gastrulation où des difficultés techniques nous ont contraint à rechercher de nouveaux protocoles opératoires dont la mise en oeuvre s'est révélée propice à l'analyse des conditions de détermination des cellules germinales au cours de la gastrulation ; cette étude encore à l'état préliminaire constitue la 3ème et dernière partie de ce mémoire.

Ce plan respecte l'ordre des opérations réalisées et non la chronologie du développement embryonnaire.

MATERIEL ET METHODES

I - ESPECE UTILISEE

Nos travaux ont été effectués sur l'Urodèle Pleurodeles waltlii Michah. dont l'élevage en aquarium ne présente pas de difficultés. L'élevage et la reproduction de ces animaux ont été décrits par GALLIEN (1952). Les embryons opérés proviennent de pontes naturelles. La conservation d'une partie des germes à une température voisine de 13° C permet d'opérer plusieurs jours sur la même ponte. Les stades ont été déterminés selon la table chronologique du développement établie par GALLIEN et DUROCHER (1957).

II - TECHNIQUES OPERATOIRES

Les méthodes et instruments utilisés sont ceux de l'embryologie expérimentale pour les Amphibiens (HAMBURGER, 1947 ; RUGH, 1948). Du fil de platine de section 0,04 mm a servi à confectionner les bistouris et les boucles nécessaires aux opérations ; celles-ci ont été réalisées sous loupe binoculaire.

Le dégangage et l'ablation du chorion sont effectués à l'aide de 2 paires de pinces fines. Les germes sont ensuite lavés dans deux bains successifs de solution opératoire stérile. Le milieu opératoire est la solution de Holtfreter ou la solution de Steinberg ; ces solutions stérilisées sont additionnées de pénicilline ou streptomycine.

Les embryons sont opérés dans des coupelles remplies de solution opératoire stérile et dont le fond est constitué de pâte à modeler ou d'Agar Agar.

3 types principaux d'expériences ont été réalisés :

- ablations et transplantations
- culture in vitro
- implantation dans le blastocèle.

Les territoires concernés dans chacune de ces techniques variant en fonction des stades, les différents schémas opératoires correspondants seront représentés avec les résultats.

A - ABLATIONS ET TRANSPLANTATIONS

Le principe de l'intervention réside dans l'ablation élective et unilatérale d'un fragment d'ecto-mésoderme. On découpe un lambeau d'ectoderme avec le mésoderme sous-jacent dans la région ventro-latérale en prenant soin de ne pas léser le blastopore. Le matériel excisé se détache parfaitement de l'endoderme sur lequel il repose. La cicatrisation terminée, il est transféré dans une autre coupelle remplie de la solution d'élevage (Holtfreter ou Steinberg stérile diluée au 1/10). Les animaux opérés sont ainsi élevés séparément. De plus, une représentation précise de chaque intervention a été rendue nécessaire pour discuter et confronter par la suite les résultats obtenus. La mortalité post-opératoire, pratiquement nulle aux stades du bourgeon caudal, atteint environ 10 % chez les neurulas.

Toutes nos ablations ont été réalisées unilatéralement du côté droit, le côté gauche non touché par l'intervention peut être considéré comme élément de comparaison. D'une manière générale et pour l'ensemble de nos opérations, seuls les animaux où la régulation des territoires enlevés s'est déroulée normalement ont été élevés et pris en considération.

Des transplantations ont également été réalisées. La coupelle opératoire contient un fond de pâte à modeler qui permettra le creusement de logettes afin d'assurer l'immobilisation complète du germe receveur nécessaire à la mise en place du greffon. Après cicatrisation (1 h environ), l'embryon est dégagé de sa logette puis transporté dans une autre coupelle contenant la solution d'élevage.

B - CULTURE IN VITRO

L'ébauche embryonnaire destinée à la mise en culture in vitro est prélevée sur le germe.

Aux stades du bourgeon caudal, cette opération nécessitera l'utilisation d'un microscalpel constitué par un éclat de lame de rasoir inséré sur une aiguille montée. Le fragment ainsi isolé est maintenu 1 à 2 heures dans la coupelle opératoire revêtue d'un fond d'agar. La cicatrisation achevée, il est placé dans une salière comportant un fond de gélose (13 %) et remplie du milieu de BARTH et BARTH (1959) additionné de sérum de cheval (5 %) et de 50000 UI de pénicilline pour 100 ml de solution. Les salières sont ensuite placées en étuve à la température constante de 20° C. Des germes témoins sont élevés en même temps ; dès que le stade 38 est atteint, nous fixons les cultures

qui se sont différenciées normalement.

Une variante de cette technique, la culture dite "en sandwich" a été utilisée au cours de notre expérimentation. Elle consiste en l'insertion de l'ébauche embryonnaire dans un lambeau d'épiblaste de manière à constituer une sorte de sandwich.

C - IMPIANTATION DANS LE BLASTOCELE

Contrairement à la culture in vitro, l'explant embryonnaire isolé est maintenu dans des conditions plus proches de son milieu naturel. Il est introduit dans la cavité blastocoelienne d'une jeune gastrula encore entourée par son chorion. Sa maintenance favorisant considérablement le développement ultérieur du germe.

Les individus opérés sont élevés séparément jusqu'au stade 38 où ils sont sacrifiés.

III - TECHNIQUES D'OBSERVATION DES RESULTATS

Les fixations histologiques sont toutes pratiquées au stade 38. Nous avons utilisé deux liquides fixateurs ; le liquide de Bouin-Hollande sans acide acétique pour les larves dépourvues de vitellus et le liquide de Smith pour les cultures. Après inclusion à la paraffine (inclusion mixte gélose - paraffine quand les pièces sont petites), des coupes de 7μ d'épaisseur sont effectuées. Elles sont ensuite colorées à l'hémalum-éosine ou au rouge nucléaire picro-indigocarmin.

IV - APPRECIATION DES RESULTATS

Les résultats des opérations réalisées se traduisent d'une manière générale par l'évaluation du nombre de c.g.p. rencontrées chez les embryons opérés ou dans les cultures. Nous avons fait appel aux méthodes de calcul statistique pour apprécier les diverses moyennes obtenues.

Pour savoir si une différence d observée entre 2 moyennes (m_1 et m_2) est, ou non, significative, il suffira de calculer, à partir des écarts types σ_1 et σ_2 de chaque échantillon, l'écart standard de la différence, Sd.

n_1 et n_2 représentent les nombres d'individus des deux échantillons étudiés. Comme les nombres sont inférieurs à 30, la distribution de l'écart réduit $t = d / Sd$ suit la loi de Student. Pour être considérée comme significative au seuil de probabilité de 95 % la différence d devra être supérieure à $t \cdot 0,05$. Sd , la valeur de $t \cdot 0,05$ étant fourni par la table de Student.

Une formule simplifiée a été utilisée pour apprécier les résultats des ablations unilatérales réalisées aux stades de la neurula et du bourgeon caudal. Dans ce cas, en effet les valeurs n_1 et n_2 sont identiques.

Le nombre de gonocytes est évalué dans les crêtes génitales droite et gauche. Seul le côté droit étant affecté par l'intervention, le côté gauche peut être considéré comme élément de comparaison. Dans chaque série opératoire on établit ainsi la différence d entre les moyennes des nombres de gonocytes du côté opéré (m_1) et du côté témoin (m_2). Pour apprécier sa signification on calcule alors l'écart standard de la différence Sd d'après la formule

$$Sd = \sqrt{\frac{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}{n-1}}$$

dans ce cas n représente le nombre d'individus opérés.

Cette méthode de calcul est inspirée de GELLER (1967).

C H A P I T R E I

REPARTITION ET MIGRATION DES C.G.P. PENDANT
LA NEURULATION ET LES STADES DU BOURGEON CAUDAL

Chez le Pleurodèle, HOUILLON (1956) a établi que les gonocytes sont identifiables de manière certaine, grâce à des critères histologiques, vers le 12ème jour du développement ce qui correspond au stade 33. En outre, le stock de cellules germinales présent à ce stade reste constant chez un individu donné jusqu'à l'âge de 4 semaines, moment où débute la multiplication. C'est sur cette particularité qu'est basé le principe des premières opérations réalisées : toute ablation unilatérale d'un territoire supposé contenir tout ou partie des c.g.p. doit entraîner un déficit du nombre de gonocytes du côté correspondant, sous réserve que la numération soit faite avant l'âge de 4 semaines et qu'il n'y ait pas de régulation. Pour pallier les inconvénients de cette démonstration par défaut nous avons procédé à la culture des territoires supposés contenir les c.g.p.. Avant d'aborder l'étude expérimentale proprement dite, il était nécessaire de connaître au préalable la localisation et la répartition des c.g.p. chez les individus témoins non opérés.

I - ETUDE DES ANIMAUX TEMOINS

A - LOCALISATION DES C.G.P.

Ces cellules sont caractérisées par leur grande dimension qui contraste fortement avec celle des cellules avoisinantes. Leur noyau au contour plurilobé renferme 1 ou 2 nucléoles et leur cytoplasme finement granulaire contient de volumineuses plaquettes vitellines.

Autre critère histologique remarquable, leur noyau est plus faiblement colorable que le noyau des autres cellules. Alors que les noyaux somatiques se colorent franchement en rouge sang, le noyau des cellules germinales se colore plus discrètement en gris bleuté après passage dans le rouge nucléaire. C'est pour cette raison que nous avons utilisé préférentiellement ce colorant nucléaire.

Au stade 38, moment où sont sacrifiées les larves, soit 17 jours environ après la ponte les gonocytes sont groupés en flots plus ou moins volumineux s'étirant le long des uretères primaires au niveau des crêtes génitales. Nous avons choisi ce stade pour 2 raisons :

- un critère morphologique : le stade 38 est facilement identifiable, il est caractérisé par la présence des membres antérieurs en forme de palette échancrée ;

- un critère histologique : à ce stade, le vitellus est presque complètement résorbé et seuls les gonocytes primaires possèdent encore de volumineux granules vitellins.

Numéro d'ordre	Nb de gonocytes		Nombre total	Ecart enregistré
	Côté droit	Côté gauche		
T 1	75	75	150	0
T 2	72	57	129	15
T 3	49	59	108	10
T 4	42	48	90	6
T 6	49	49	98	0
T 7	58	46	104	12
T 8	48	45	93	3
T 9	28	17	45	11
T 10	27	36	63	9
T 12	64	47	111	17
T 13	42	48	90	6
T 14	64	64	128	0
T 15	49	57	106	8
T 16	55	58	113	3
T 17	42	60	102	18
T 18	10	22	32	12
T 19	69	64	133	5
T 20	69	80	149	11
T 21	40	26	66	14
T 22	18	33	51	15
T 23	34	26	60	8
T 24	52	44	96	8
Moyenne	48	48	96	



Tableau 1 - Numérations gonocytaires chez les individus témoins.

B - REPARTITION DES C.G.P.

Cette analyse a été faite sur 22 animaux, non opérés, provenant des différentes pontes échelonnées au cours de l'année. Les c.g.p., en place au niveau des crêtes génitales, ne font que légèrement saillie dans la cavité coelomique, se plaçant au bord latéro-interne de l'uretère primaire entre celui-ci et le mésentère dorsal. Isolées au niveau le plus antérieur, elles se groupent en îlots d'autant plus volumineux que l'on se rapproche du cloaque. Le tableau 1 rend compte de la répartition des gonocytes entre les crêtes génitales droite et gauche.

C - DISCUSSION

L'évaluation exacte du nombre de c.g.p. n'est pas toujours aisée, surtout dans certains îlots très denses. L'approximation peut être évaluée à 10 %.

Le nombre moyen de gonocytes observés au niveau de chaque crête génitale est proche de celui établi par HOUILLON (1956). Cet auteur montrait que le nombre total de gonocytes, pour chaque larve, oscillait autour de 100 ; les limites extrêmes étant de 121 à 60. Nous avons pour notre part enregistré des écarts plus importants, 150 à 32. Toutefois ces cas restent exceptionnels et la moyenne observée (96) est très voisine.

Dans la majorité des cas, les côtés droit et gauche sont colonisés par un nombre pratiquement identique de cellules germinales. Cette première analyse aboutit à la conclusion que les gonocytes sont en nombre voisin dans les crêtes génitales droite et gauche mais ce nombre varie d'une larve à l'autre.

II - ETUDE EXPERIMENTALE

A - AU COURS DE LA NEURULATION

L'ablation complète, au stade de la jeune neurula, du mésoderme latéral présomptif chez Ambystoma mexicanum, expérience réalisée par NIEUWKOOP (1946), entraînait la stérilité totale chez 4 individus opérés sur 7. La réduction était importante dans les autres cas. Il s'avérait important de vérifier ces résultats chez le Pleurodèle c'est pourquoi nous avons pratiqué un certain nombre d'opérations à différents stades de la neurulation 2 techniques complémentaires ont été employées :

- la première, que l'on peut qualifier d'estimation par défaut, consiste en l'ablation unilatérale d'un fragment ecto-mésodermique.

- la seconde méthode a consisté à la mise en culture in vitro de fragments plus importants supposés contenir l'ensemble des c.g.p. Cette méthode présente l'avantage de mettre en évidence de manière concrète les éventuelles c.g.p.

1 - Ablations

La neurulation s'étend de la 56ème heure après la ponte jusqu'à la fermeture complète du tube neural qui s'effectue vers la 80ème heure (stades 14 à 20). Toutes les ablations réalisées appartiennent au type A décrit dans la figure 1 : ablation ventrale postérieure.

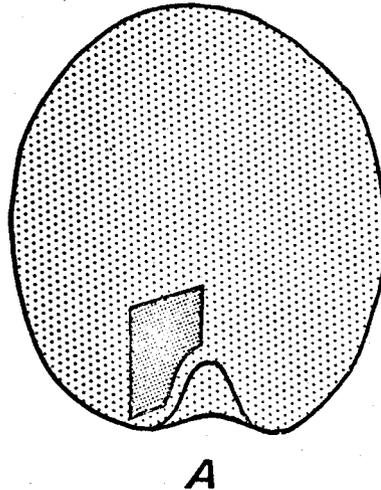


Fig. 1 - Ablation d'ecto-mésoderme ventral au stade neurula : type A.

a) Jeune neurula (st. 15)

A ce stade l'embryon est âgé de 69 heures, la plaque neurale reste largement étalée au niveau céphalique. Au cours de l'opération on distingue nettement le feuillet mésodermique ; celui-ci dont l'invagination est récente, poursuit son mouvement d'extension vers la région antérieure.

Les gonocytes des crêtes génitales droite et gauche ont été dénombrés sur les larves opérées et élevées jusqu'au stade 38.

Numéro d'ordre	Nombre de gonocytes	
	Côté gauche Témoin	Côté droit Opéré
S 30-5	45	18
S 30-6	41	0
S 30-7	33	32
S 30-8	50	1
S 30-11	49	9
O 1-7	36	13
O 1-8	47	10
O 1-9	29	5
O 1-10	21	2
O 11-1	35	3
O 11-3	33	16
O 13-3	39	11
O 16-4	14	0
O 16-5	28	1
D 2-1	44	7
D 2-2	76	4
D 2-3	46	12
D 2-4	57	39
D 2-5	56	13
D 2-6	45	17
D 2-7	67	15
D 2-8	30	13
D 2-9	32	11
D 2-10	53	21
D 2-11	52	0
D 2-12	40	35
Moyenne	42	12



Tableau 2 - Nombre de gonocytes réalisées après ablation du type A au stade 15.

Tableau 3 - Résultats et signification des expériences d'ablation réalisées aux stades neurula et du bourgeon caudal.

Numéro de l'expérience	Stade	Type d'opération	Nombre d'opération	Nombre moyen de gonocytes		Différence $d = m_2 - m_1$	Ecart standard de la différence $t 0,05 Sd$	Significatif : + Non significatif : -
				Côté gauche m_2	Côté droit m_1			
1	15	A	26	42	12	30	7	+
2	17	A	10	33	23	10	9,4	+
3	19/20	A	11	31	14	17	6,8	+
4	21	B	14	32	18	14	8,6	+
5	21	D	10	34	31	3	11,9	-
6	22	B	14	51	50	1	18,8	-
7	22	C	8	41	37	4	14,1	-
8	22	D	15	37	10	27	7,5	+
9	22	F	16	31	13	18	8,7	+
10	22	G	22	32	25	7	6	+
11	23	C	12	40	43	3	21,7	-
12	23	D	11	36	28	8	9,7	-
13	24	C	11	44	43	1	15,1	-
14	24	D	9	48	43	5	15,1	-
15	23 et 24	E	21	39	8	31	6	+
16	25	C	10	40	41	1	15,7	-
17	25	D	13	35	42	7	21,6	-
18	27	D	10	51	48	3	17,8	-

815
L112
508

Numéro d'ordre	Nombre de gonocytes	
	Côté gauche	Côté droit
	Témoin	Opéré
S 29-18	36	20
S 30-9	25	32
S 30-10	42	47
O 1-3	40	25
O 1-40	28	0
O 1-41	37	17
O 1-5	38	39
O 13-5	23	16
O 14-2	28	16
O 11-2	28	19
Moyenne	33	23

Tableau 4 - Numérations gonocytaires réalisées après ablations de type A au stade 17.

Numéro d'ordre	Nombre de gonocytes	
	Côté gauche	Côté droit
	Témoin	Opéré
S 29-3	27	24
S 29-11	29	11
S 29-12	34	18
S 29-13	23	11
S 29-15	16	4
S 29-17	48	20
O 1-60	39	8
O 1-61	20	16
O 1-62	36	13
O 14-30	31	14
O 14-31	34	15
Moyenne	31	14

Tableau 5 - Numérations gonocytaires réalisées après ablations de type A au stade 19-20.



Les résultats de ces numérations consignés dans le tableau 2 font apparaître une moyenne de 42 gonocytes du côté témoin et 12 du côté opéré. La différence d. est très supérieure à l'écart standard de la différence (expérience 1 du tableau 3). L'ablation entraîne donc un déficit important de cellules germinales. On constate que chez 3 individus sur 26 (S 30-6, O 16-4, D 2-11) le déficit est total. Par contre dans les cas S 30-7, D 2-4 et D 2-12, les opérations n'ont pas provoqué de différences significatives par rapport au côté témoin et un éventuel déficit ne peut être apprécié. Dans les cas où le nombre de gonocytes restant se situe entre 10 et 20 (12 cas sur 26), on remarque que ces cellules sont pour la plupart groupées en un seul flot situé en position très postérieure. Ceci est en relation, nous semble-t-il, avec la technique opératoire. En effet, quand la limite du territoire enlevé est proche du blastopore il apparaît des anomalies telles que l'hypertrophie, le dédoublement et le déplacement de l'uretère primaire. Il s'est donc avéré nécessaire de conserver la zone voisine du blastopore, ce qui a dû provoquer le maintien de certaines cellules germinales présentes à ce niveau et retrouvées ultérieurement à proximité du cloaque.

b) Neurula moyenne (st. 17)

A ce stade l'embryon est âgé de 70 heures et les bourrelets neuraux sont soudés dans la région troncale. L'opération est toujours du type A et les résultats sont consignés dans le tableau 4.

Sur les 10 animaux opérés, un seul présente une crête génitale droite stérile. Le déficit rencontré chez les autres animaux semble d'autant plus faible que la moyenne enregistrée du côté témoin est exceptionnellement basse. Il est néanmoins significatif comme le montrent les résultats numériques obtenus (expérience 2 du tableau 3).

c) Neurula âgée (st. 19-20)

A ce stade l'embryon s'est allongé, l'accolement des bourrelets neuraux s'est réalisé dans la région céphalique mais leur soudure est incomplète. Ce stade est atteint vers la 75ème heure après la ponte. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5. Nous retrouvons du côté opéré, le déficit déjà rencontré après les ablations effectuées aux stades 15 et 17. Nous pouvons l'évaluer à environ 50 %, il est hautement significatif (expérience 3 du tableau 3).

En conclusion, il apparaît que l'ablation d'un territoire ecto-mésodermique ventro-latéral aux stades 15, 17 et 19-20 entraîne un déficit

significatif des gonocytes. On peut donc assurer que la majeure partie des c.g.p. se situe au voisinage du blastopore dès la fin de la gastrulation. Afin de confirmer ces résultats nous avons procédé à la mise en culture de ce territoire.

2 - Culture in vitro

a) Protocole opératoire

Le territoire excisé bilatéral correspond à l'ensemble du mésoderme latéral présomptif déjà invaginé et à celui, en particulier le mésoblaste caudal, encore présent en surface autour de la fente blastoporale. Afin de s'assurer de la présence de toutes les c.g.p., l'ablation a été volontairement étendue à toute la région bordant le blastopore. La figure 2 représente le protocole opératoire choisi.

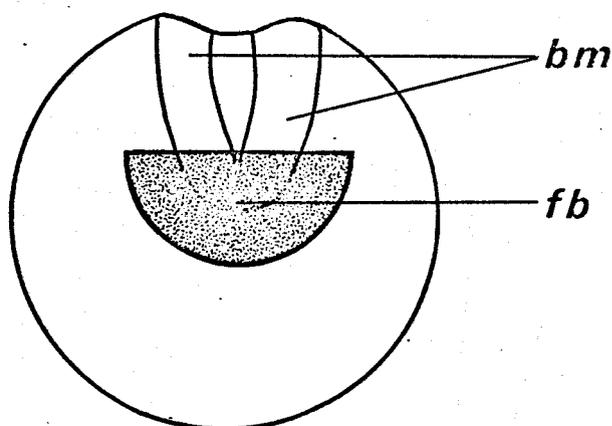


Fig. 2 - Représentation du secteur ecto-mésodermique prélevé au stade neurula et mis en culture.

bm, bourrelets médullaires ; fb, fente blastoporale.

Ce territoire est conforme à celui défini par NIEUWKOOP (1946) lors de ses expériences d'ablation complète du mésoderme latéral de la jeune neurula.

De nombreux tissus présomptifs se trouvent ainsi prélevés : du tissu nerveux (extrémité postérieure des bourrelets neuraux), du tissu mésodermique (mésoblaste latéral et caudal, une partie des somites) et de l'ectoderme banal. Seul le feuillet endodermique n'est pas touché par l'intervention.

Les opérations sont réalisées aux stades 15, 17 et 19-20. Les explants sont mis en culture suivant la technique décrite précédemment.

b) Résultats

- Aspect macroscopique
.....

Les fragments ecto-mésodermiques ainsi délimités évoluent dans la majorité des cas en vésicules de taille variable. Le pourcentage de dissociation constaté est faible puisque sur les 85 opérations effectuées, aux différents stades de la neurulation, 68 prestations ont pu être analysées (ce qui correspond à 80 % environ de réussite). Ces vésicules présentent parfois à l'une de leurs extrémités une réaction de type caudal, cette présence ne nous étonne pas étant donné la provenance des tissus isolés. De nombreux mélanophores se répartissent à leur surface. Par transparence et dans les cas les plus favorables il est possible d'observer de fines travées de nature probablement mésenchymateuse sillonnant l'intérieur d'une vaste cavité, celle-ci occupant alors la presque totalité de la culture. Dans ce dernier cas, un matériel dense se concentre à l'un des pôles. L'importance de cette cavité semble en relation avec le degré de différenciation de l'explant ; en effet les petites vésicules présentent toujours un aspect compact et l'examen histologique y révèle la présence d'un mésenchyme abondant, remplissant toute la prestation.

- Aspect microscopique
.....

D'une manière générale, l'enveloppe ectodermique de la prestation est tapissée intérieurement d'une couche de mésenchyme lâche se creusant d'une cavité que l'on peut donc assimiler à une cavité coelomique (Pl. I, fig. A et D).

Au sein de ce mésenchyme, s'observent de nombreux éléments cellulaires dont la nature n'est pas toujours facile à préciser.

Des formations nerveuses, plus ou moins bien organisées, sont parfois rencontrées ; elles sont souvent associées aux cellules pigmentaires et leur site privilégié semble être la région donnant naissance à la réaction de type caudal.

Dans un nombre plus restreint de cas nous avons identifié quelques cellules musculaires.

St. 15 : N : ≠ : +		St. 17 : N : ≠ : +		St. 19/20 : N : ≠ : +	
Série B	11 : 9 : 5	Série N	16 : 14 : 10	Série D	17 : 14 : 13
Série C	24 : 21 : 15	Série U	12 : 6 : 6	Série V	5 : 4 : 4
	35 : 30 : 20		28 : 20 : 16		22 : 18 : 17
N° de l'expérience					
*B 16	29	*N 1	59	D 2	75
*B 18	17	N 2	61	D 3	63
*B 20	23	*N 3	62	D 4	93
B 22	30	N 5	89	D 5	50
B 24	17	*N 6	75	D 7	76
		N 7	68	D 8	23
C 2	49	N 8	89	D 6	48
C 4	69	N 9	46	D 11	91
C 5	34	N 10	76	D 13	41
C 7	62	N 11	56	D 14	92
C 11	60			D 15	107
C 12	51	U 2	50	D 16	116
C 13	29	U 4	40	D 12	97
C 15	113	U 7	62		
C 16	33	U 12	81	V 28	28
C 18	16	U 11	42	V 29	92
C 8	89	U 10	54	V 30	59
C 10	53			V 32	48
C 20	30				
C 19	44				
C 21	46				
Moyenne	45	Moyenne	64	Moyenne	59

Tableau 6 - Numérations gonocytaires réalisées après mise en culture de territoire mésodermique latéral présomptif prélevé à différents stades de la neurulation.



N : Nombre d'opérations

≠ : Nombre d'explants différenciés

+ : Nombre de cas où les c.g.p. sont présentes.

Des cellules germinales ont été mises en évidence dans la majorité des prestations obtenues, néanmoins elles n'ont pu être dénombrées avec certitude que dans 53 cas sur 68. Le tableau 6 rend compte de leur répartition. Dans les autres cas, un vitellus trop abondant masquait les différents tissus et il était très difficile de les distinguer des autres éléments cellulaires présents ; n'ont donc été prises en considération que les cellules présentant toutes les caractéristiques histologiques communes aux c.g.p. et définies précédemment.

De l'ensemble des observations réalisées se dégagent deux types principaux de répartition :

- dans le premier type, le moins fréquent, les gonocytes sont répartis au sein même du mésenchyme, isolés ou rassemblés en petits îlots (Pl. I, fig. B). Il n'a pas été possible de définir des relations topographiques précises les liant aux structures nerveuses ou mésodermiques présentes. Ces cellules n'occupent pas un emplacement privilégié au sein de la vésicule.

- dans le second type, il concerne la majorité des prestations, les gonocytes sont groupés en un seul îlot, souvent volumineux faisant saillie dans la cavité coelomique (Pl. I, fig. A et D). L'îlot est relié, plus ou moins étroitement, au tissu mésenchymateux doublant l'enveloppe ectodermique (Pl. I, fig. C, E et F). Il est souvent inclus dans l'une des travées sillonnant cette cavité. L'association constante de ces cellules avec des éléments d'origine mésodermique suggère l'origine mésodermique des c.g.p..

Nous constatons à la lecture du tableau 6, que les valeurs rencontrées varient considérablement d'un individu à l'autre et ceci quelque soit le stade où a été prélevé le territoire supposé contenir les c.g.p.. Ces fluctuations sont comparables à celles enregistrées après numération des individus témoins non opérés (tableau 1).

Par contre les moyennes, 45 au st. 15, 64 au st. 17 et 59 au st. 19-20 sont sensiblement différentes ; le déficit est important comparé à la moyenne des témoins (96). Cet écart peut s'expliquer par la technique opératoire utilisée. En effet après excision du territoire, le fragment prélevé est conservé en milieu opératoire pour que s'effectue la cicatrisation ; durant cette période le fragment se replie sur lui-même, devient sphérique et une partie des cellules s'élimine par la même. Outre le fait que toutes les c.g.p. n'ont peut être pas été prélevées au cours de l'excision, il est logique de penser que de nombreuses c.g.p. se sont retrouvées dans le milieu. A titre de vérification nous avons élevé un certain nombre de germes donneurs d'explants jusqu'au st. 38, où ils ont été sacrifiés. Cette étude n'a pu être réalisée

N° de l'expérience	Nombre de c.g.p.	
	Donneur	Explant
B 16	0	29
B 17	0	-
B 18	0	17
B 19	0	-
B 20	0	23
B 21	10	-
N 1	2	59
N 3	0	62
N 4	5	111
N 6	0	75
N 9	2	111
N 12	0	111
N 15	2	-
13 cas		

Tableau 7 - Numérations gonocytaires réalisées après ablation bilatérale de l'ectomésoderme latéroventral au stade neurula (st. 15 et 17).

- : dissociation ou différenciation insuffisante de l'explant.

111 : illisible.



que sur un nombre peu élevé d'individus ; en effet il s'est avéré que l'ablation provoquait des perturbations qui affectaient gravement la suite du développement. La cicatrisation des animaux opérés restait incomplète, l'ectoderme ne recouvrant que partiellement la région endodermique mise à nu après ablation.

Seules 13 larves ont pu être étudiées ; celles-ci présentaient de nombreuses anomalies affectant la région postérieure de l'animal. Outre un raccourcissement sensible de cette région, on notait l'ouverture fréquente de l'intestin sur le flanc, une réduction parfois importante de la cavité coelomique avoisinante et des dédoublements de l'uretère primaire. Les résultats des numérations des c.g.p. rencontrées dans les crêtes génitales sont rassemblés dans le tableau 7.

Sur 13 cas, 8 se sont révélés totalement stériles et 4 partiellement. Ces résultats semblent significatifs. L'ablation bilatérale de l'ecto-mésoderme latéro-ventral entraîne la stérilité dans la majorité des cas ou une réduction considérable du nombre de c.g.p. chez les individus opérés. Nous confirmons ainsi les travaux de NIEUWKOOP (1946). Aucune régulation n'apparaît chez les individus opérés. Les explants correspondants, mis en culture in vitro, renferment effectivement des c.g.p. (tableau 7).

A la lumière de ces résultats nous pouvons affirmer que la majorité des c.g.p. se trouve répartie dans le mésoderme latéral présomptif bordant le blastopore. Les opérations réalisées, tantôt par ablation unilatérale ou bilatérale, tantôt en culture in vitro indiquent que ces cellules ne migrent pas au cours de la neurulation.

B - AUX STADES DU BOURGEON CAUDAL

Cette période débute avec la fermeture complète du tube neural et s'achève à l'éclosion, soit 12 jours environ après la ponte. Compte tenu de la précédente conclusion, il est clair que c'est au cours de cette étape du développement que les cellules germinales quittent leur position ventro-latérale pour atteindre les crêtes génitales. Les interventions ont donc été réalisées en divers endroits sur des stades de plus en plus âgés. Comme lors de l'étude de la neurulation la technique de culture in vitro sera utilisée pour compléter les résultats des ablations effectuées.

1 - Ablations

Divers types d'ablations ont été réalisés selon les stades, ils sont représentés schématiquement sur la fig. 3.

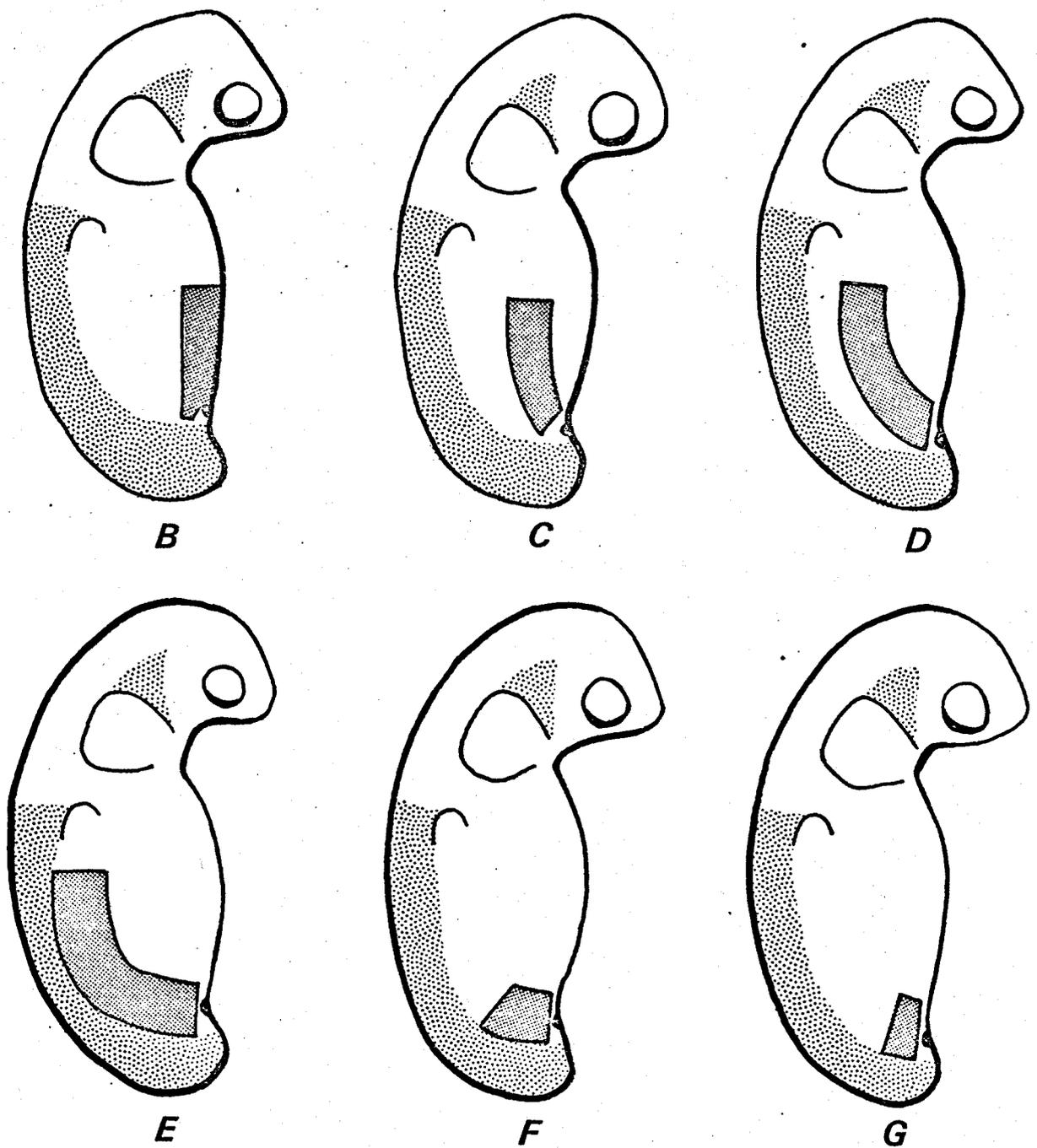


Fig. 3 - Schémas des différents types d'opérations réalisés aux stades du bourgeon caudal.

B, ablation d'ecto-mésoderme ventral ; C, ablation d'ecto-mésoderme latéro-ventral ; D, ablation d'ecto-mésoderme latéral ; E, ablation d'ecto-mésoderme intermédiaire ; F et G, ablation d'ecto-mésoderme intermédiaire postérieur.

Numéro d'ordre	Nombre de gonocytes	
	Côté gauche	Côté droit
	Témoin	Opéré
A MV F 15-4	38	15
A MV F 15-5	37	17
A MV F 15-1	40	36
A MV F 15-6	31	32
F 17-1	33	29
F 17-5	32	21
S 29-1	38	26
S 29-10	34	1
S 29-11	49	33
S 29-60	30	23
S 29-61	38	10
O 2-10	19	6
O 2-130	22	9
O 2-131	11	0
Moyenne	32	18

Tableau 8 - Numérations gonocytaires réalisées après ablations de type B au stade 21.

Numéro d'ordre	Nombre de gonocytes	
	Côté gauche	Côté droit
	Témoin	Opéré
I 31-14	15	0
AV 4-5	63	28
S 29-4	34	15
S 29-101	49	16
S 29-102	36	11
S 30-10	29	0
S 30-11	37	10
O 2-40	43	13
O 2-41	44	14
O 2-50	43	21
O 2-51	27	8
O 2-6	29	3
O 2-70	46	8
O 2-71	29	6
Moyenne	37	10

Tableau 9 - Numérations gonocytaires réalisées après ablations de type D au stade 22.



a) Très jeune bourgeon caudal (st. 21)

Les ablations sont du type B et D conformément à la figure 3.

- Ablation ventrale (type B)
.....

Les résultats consignés dans le tableau 8 font apparaître un déficit important dans la plupart des cas. Le calcul statistique précédemment utilisé donne pour t 0,05. Sd une valeur de 8,6. La différence d'entre les 2 moyennes s'élevant à 14 est significative. Les résultats obtenus sont analogues à ceux enregistrés au stade 19-20 pour une intervention pratiquement identique. Dans quelques cas, néanmoins, le déficit est insignifiant ; on pouvait supposer que chez les individus correspondants les cellules germinales avaient amorcé leur migration. Pour vérifier cette supposition nous avons réalisé au même stade des opérations en position plus dorsale.

- Ablation latérale (type D)
.....

Aucun des 10 animaux opérés ne présente de déficit net. Les moyennes des gonocytes des côtés droit et gauche sont donc très voisines (34 et 31), leur différence est inférieure à l'écart standard qui s'élève à 11,9.

b) Jeune bourgeon caudal (st. 22)

Les ébauches du pronéphros et des bourgeons branchiaux sont apparues et font également saillie. Les ablations ventrales (type B) et latéro-ventrales (type C) sont sans effet. Les résultats numériques (expériences 6 et 7 du tableau 3) font apparaître une différence dépourvue de toute signification.

- Ablation latérale (type D)
.....

Les résultats rassemblés dans le tableau 9 traduisent un déficit général et important du côté opéré. 3 individus sur 15 présentent un côté droit totalement dépourvu de gonocytes. Dans 10 cas sur 15, le nombre de gonocytes décelés est inférieur à 16 et la plupart de ceux-ci se retrouvent groupés en un seul flot. Le déficit qui atteint chacun des 15 animaux opérés ($d = 27$) est très supérieur à l'écart standard de la différence (expérience 8 du tableau 3).

Des précisions complémentaires pouvaient être apportées en restreignant les territoires excisés à la région postérieure de l'embryon. Les ablations de types F et G ont été réalisées dans cette perspective.

Numéro d'ordre	Nombre de gonocytes	
	Côté gauche Témoin	Côté droit Opéré
0 3-20	49	9
0 3-21	23	6
0 3-22	66	23
0 7-10	30	5
0 7-11	32	20
0 7-12	35	1
0 7-20	32	4
0 7-21	26	14
0 7-22	45	40
0 7-23	24	9
0 7-24	31	13
0 7-25	24	21
0 7-26	30	7
11 5-4	16	11
AV 16-30	12	26
AV 16-31	28	5
Moyenne	31	13

Tableau 10 - Numérations gonocytaires réalisées après ablations de type F au stade 22.



Numéro d'ordre	Nombre de gonocytes	
	Côté gauche Témoin	Côté droit Opéré
AV 16-20	31	45
AV 16-21	26	22
8. 5-10	20	30
8. 5-11	31	21
8. 5-12	36	33
11. 5-30	26	17
11. 5-31	18	27
S 19-10	50	45
S 19-11	43	29
S 19-12	33	11
S 19-13	40	34
S 19-14	42	15
S 19-20	34	28
S 19-21	26	15
S 23-10	25	21
S 23-11	26	15
S 23-12	23	23
S 23-30	24	22
S 23-31	42	33
S 23-32	15	20
S 28-3	51	23
S 28-4	49	29
Moyenne	32	25



Tableau 11 - Numérations gonocytaires réalisées après ablations du type G au stade 22.

Numéro d'ordre	Nombre de gonocytes	
	Côté gauche Témoin	Côté droit Opéré
L 1	40	2
L 2	49	0
L 3	35	13
L 5	47	0
L 16	44	10
L 17	40	0
O 7-30	25	1
O 7-31	47	13
O 7-32	23	11
8. 5-30	30	10
8. 5-31	33	16
8. 5-32	11	3
S 29-10	55	26
S 29-11	32	28
S 29-12	55	8
S 29-30	45	3
S 29-31	51	2
S 29-32	43	9
S 29-33	44	3
S 29-34	48	10
Moyenne	39	8

Tableau 12 - Numérations gonocytaires réalisées après ablations de type E au stade 23-24.



- Ablation d'ecto-mésoderme intermédiaire (type F)
.....

Nous observons du côté opéré (tableau 10) un déficit appréciable et hautement significatif. ($d : 18, t 0,05. Sd = 8,7$). Sur 16 individus, seuls 5 présentent un nombre relativement important de gonocytes au niveau de la crête génitale droite. Dans tous les autres cas, l'opération a donc entraîné une réduction sensible du nombre de cellules germinales.

- Ablation d'ecto-mésoderme intermédiaire (type G)
.....

L'excision est très localisée et s'approche le plus possible du blastopore. Les résultats sont consignés dans le tableau 11.

Ce type d'opération entraîne encore un déficit certain du côté opéré mais celui-ci est beaucoup moins significatif que dans le type F précédent ($d = 7, t 0,05. Sd = 6$). Une partie des gonocytes n'est donc pas affectée par l'intervention. La comparaison avec l'expérience précédente montre que ce lot de cellules a déjà migré en direction dorsale.

c) Bourgeon caudal moyen (st. 23 et 24)

Les opérations de type C et D n'ont apporté aucun résultat significatif (expériences 11, 12, 13 et 14 du tableau 3).

- Ablation de l'ecto-mésoderme intermédiaire (type E)
.....

Le territoire excisé, limité dorsalement par la base des somites, s'étend du 7ème somite aux abords du blastopore. Les résultats sont résumés dans le tableau 12.

Chez toutes les larves (S 29-10 et S 29-11 exceptées), le nombre de gonocytes présents est très réduit ; la crête génitale droite est même stérile dans 3 cas. Le déficit constaté est significatif (expérience 15 du tableau 3). L'uretère primaire droit fait défaut depuis le niveau antérieur de l'intervention jusqu'au cloaque, il subsiste néanmoins dans certaines expériences (07-32, 8. 5-31, 8. 5-32) où l'ablation a été incomplète. Le plus souvent les gonocytes rencontrés occupent la base des somites, à l'emplacement normal de l'uretère primaire. On peut assurer qu'aux stades 23 et 24 les c.g.p. se situent dans le mésoderme intermédiaire, en position superficielle, le long de l'uretère primaire.

d) Bourgeon caudal âgé (st. 25, 26 et 27)

Les opérations réalisées sur le bourgeon caudal âgé confirment l'expérience précédente. Les ablations ventro-latérales et latérales sont sans effet sur le stock de gonocytes (expériences 16, 17 et 18 du tableau 3). A titre de contrôle, nous avons vérifié l'efficacité de l'ablation de l'ecto-mésoderme intermédiaire au stade 26 : à la suite de 3 expériences de ce type nous n'avons retrouvé respectivement que 3, 1 et 5 cellules du côté droit.

Les résultats obtenus nous montrent qu'il est difficile d'obtenir une élimination complète des c.g.p. au moyen d'ablations. La technique de culture in vitro s'étant révélée satisfaisante lors de l'étude de la neurulation, a été utilisée aux stades plus âgés du bourgeon caudal.

2 - Culture in vitro

a) Protocole opératoire

L'embryon est découpé en plusieurs secteurs qui diffèrent selon le stade envisagé. Les figures 4 et 5 présentent les différents territoires ainsi isolés et mis en culture selon la technique employée pour l'étude des stades précédents. Les secteurs successivement délimités n'ont pas été choisis au hasard, ils tiennent rigoureusement compte de l'analyse des résultats rapportés antérieurement. Il s'agit de déterminer avec le plus de précision possible le trajet emprunté par les c.g.p. pour atteindre les futures crêtes génitales.

b) Résultats

- Stade 21
.....

Les 3 secteurs isolés correspondent à l'extrémité postérieure de l'embryon (Fig. 4). Les secteurs 1 et 2, les plus petits et renfermant une masse de vitellus importante sont les plus sensibles à la dissociation ; cela ne nous surprend pas car nous savons que l'endoblaste prélevé seul et même à ce stade se différencie de manière très imparfaite. L'épiderme en place ne suffit pas à assurer une cicatrisation convenable de l'explant. Nous ne prendrons en considération que les cas où les 3 secteurs issus d'un seul et même individu se sont effectivement différenciés. Les prestations obtenues sont conformes à leur valeur présomptive.

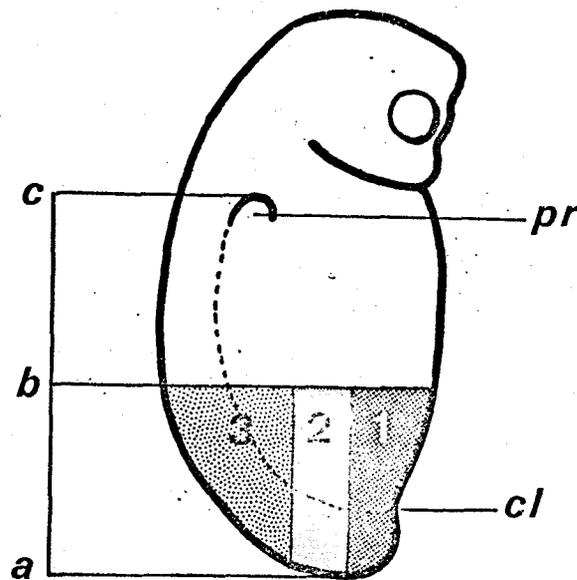


Fig. 4 - Représentation des différents secteurs découpés aux stades 21 et 22 et mis en culture.

ab = bc ; cl, cloaque ; pr, pronéphros.

Le secteur 1 : le plus ventral, évolue en une vésicule plurilobée généralement de petite taille (Pl. II, fig. A). La présence d'un appendice caudal n'est pas constante. Un épithélium de nature ectodermique ou endodermique (la distinction est parfois malaisée) recouvre un mésenchyme abondant. Au sein de ce tissu s'observent quelques rares fibres musculaires sans organisation bien précise. Le tissu nerveux, quand il est bien développé, se rencontre toujours au voisinage de la réaction caudale, mais le plus souvent il se réduit à quelques amas cellulaires peu étendus. Nous n'avons pas rencontré de structures tubulaires pouvant être comparées à des portions d'uretère primaire.

L'endoblaste prélevé ne se différencie jamais en une structure typique intestinale, tout au plus contribue-t-il à la formation de l'enveloppe vésiculaire.

Des c.g.p. ont été mises en évidence dans toutes les prestations étudiées. Le tableau 13 précise leur répartition. Elles sont généralement groupées en 2 flots d'importance inégale au niveau du mésenchyme. L'absence de structures axiales ne nous permet pas de préciser leur localisation dans la vésicule.

N° de l'expérience	Secteurs			Total
	1	2	3	
B 1	62	0	0	62
B 2	56	0	0	56
B 3	68	11	0	79
B 4	61	0	0	61
B 5	57	4	0	61
B 8	51	13	0	64
C 1	42	0	0	42
C 2	34	10	0	44
C 4	39	3	0	42
C 5	50	6	0	56
D 1	46	10	0	56
D 2	37	4	0	41
D 3	35	3	0	38
Moyenne	49	5	0	54

Tableau 13 - Numérations gonocytaires réalisées après mise en culture des différents secteurs prélevés au stade du très jeune bourgeon caudal (st. 21).

N° de l'expérience	Secteurs			Total
	1	2	3	
C 6	21	14	1	36
C 7	31	25	3	59
C 8	9	31	0	40
C 9	25	6	0	31
C 10	29	23	0	52
C 11	11	22	0	33
C 13	20	24	0	44
D 4	7	30	6	43
D 5	30	60	7	97
D 6	11	44	0	55
D 7	54	25	4	83
Moyenne	22	28	2	52

Tableau 14 - Numérations gonocytaires réalisées après mise en culture des différents secteurs prélevés au stade du jeune bourgeon caudal (st. 22).



Le secteur 2 : celui-ci évolue en une vésicule présentant une symétrie bilatérale très apparente. La prestation bilobée, parfois quadrilobée, se caractérise en effet par l'émission d'un appendice caudal souvent très développé (Pl. II, fig. B et C).

L'examen histologique révèle un niveau d'organisation proche de celui rencontré chez des témoins ; tube nerveux et corde en position axiale, myotomes et mésenchyme sur les bords latéraux. Des structures tubulaires paires, correspondant vraisemblablement à la différenciation des uretères primaires, sont parfois distinguées.

Des c.g.p. ont été décelées mais seulement dans 9 cas et en nombre beaucoup plus restreint que dans le secteur 1. Elles se situent toujours dans le tissu mésenchymateux bordant ventralement la base des myotomes.

Le secteur 3 : il évolue de manière semblable. On note toutefois un degré d'organisation plus élevé. Une nageoire dorsale, bien formée, souligne la symétrie bilatérale présente (Pl. II, fig. D). Une constriction délimite 2 lobes ventraux parfaitement dessinés. Les uretères primaires apparaissent distinctement sous les somites. Un mésentère délimite 2 cavités coelomiques reposant sur un épithélium d'origine endodermique. La culture de ce secteur dorsal ne révèle pas la présence de c.g.p.

En conclusion, la comparaison des résultats obtenus après mise en culture des secteurs 1, 2 et 3 nous permet de souligner les points suivants :

- la majorité des c.g.p. est située dans le mésoderme intermédiaire au voisinage du blastopore (secteur 1). Seule une petite partie d'entre elles a amorcée sa migration vers le secteur intermédiaire (secteur 2).
- les numérations réalisées indiquent un déficit relativement important par rapport aux valeurs estimées chez les témoins. Ces écarts traduisent sans doute des pertes de matériel pendant la cicatrisation des explants.

- Stade 22
.....

Le protocole opératoire reste le même ; signalons toutefois que l'allongement des embryons a entraîné de légères modifications de la taille des explants. Les prestations obtenues après mise en culture des différents secteurs sont comparables aux précédentes. L'organisation des vésicules est très proche de celle décrite ci-dessus et ne mérite pas d'être précisée. Seule la localisation des c.g.p. décelées dans les différents secteurs retiendra notre attention. Le tableau 14 rapporte cette répartition.

Le secteur intermédiaire (secteur 2) se montre le plus riche en

c.g.p.. Les 11 cas étudiés renferment tous des c.g.p.. Le secteur ventral (secteur 1) contient toujours une proportion importante de cellules germinales. Le secteur dorsal (secteur 3) est même colonisé dans 5 cas, ce qui ne s'était pas observé au stade 21. La comparaison des résultats obtenus aux stades 21 et 22 est très intéressante. Elle révèle de profonds changements dans la répartition des c.g.p.. Le stock important de c.g.p. localisé dans le secteur ventral au st. 21 (en moyenne 49 g.) s'est considérablement réduit au st. 22 où la moyenne n'est plus que de 22). Ce déficit conséquent traduit la migration d'une grande partie des gonocytes vers le secteur intermédiaire. Les valeurs rencontrées dans ce secteur au stade 22 démontrent de manière irréfutable la progression en direction dorsale des éléments germinaux, quelques-uns d'entre eux atteignent même le secteur le plus dorsal.

Nous confirmons ainsi les conclusions émises après les diverses ablations réalisées à des stades analogues. La migration des c.g.p. s'effectue effectivement entre les stades 21 et 22.

- Stade 24
.....

Compte tenu des résultats précédents et de l'allongement continu du germe, nous avons modifié sensiblement le protocole opératoire. Le choix des secteurs a été effectué de manière à couvrir la totalité de la région éventuellement colonisée par les gonocytes. 3 secteurs ont ainsi été définis conformément à la figure 5.

Le secteur ventral (secteur V) se présente comme l'homologue des secteurs 1 et 2. Le secteur dorsal postérieur (secteur D 1) correspond à peu près au secteur 3. Un nouveau secteur plus antérieur (secteur D 2) complète notre choix. Les prestations obtenues diffèrent peu de celles analysées précédemment.

Le secteur caudal C évolue en une portion de queue typique (Pl. II, fig. E).

Les secteurs dorsaux D 1 et D 2 se différencient en vésicules caractérisées par une symétrie bilatérale qui s'exprime notamment par une nageoire dorsale très apparente (Pl. II, fig. G et H).

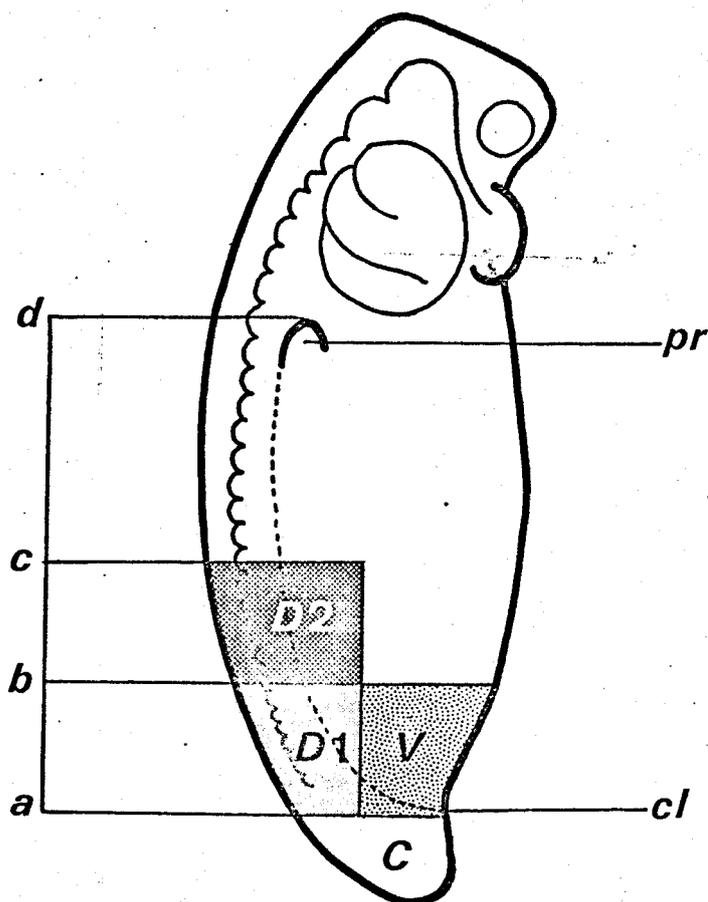


Fig. 5 - Représentation des différents secteurs découpés aux stades 24 et 26 et mis en culture.

$ab = bc = ad / 4$; cl, cloaque ; pr, pronéphros.

L'examen histologique montre une organisation très proche de celle observée chez des larves non opérées : un tube nerveux, une chorde et des somites en position dorsale ; la région ventrale étant occupée par des structures d'origine mésodermique, lames latérales et cavités coelomiques (Pl. III, fig. A, B et C). 2 canaux, plus ou moins bien développés, correspondant aux uretères primaires s'observent dans la plupart des cas étudiés (Pl. III, fig. B). L'endoderme participe à l'enveloppe vésiculaire ; comme dans les exemples précédents, il ne se différencie jamais en intestin typique (Pl. III, fig. A, B et C).

Des cellules germinales primordiales ont été mises en évidence, plus particulièrement dans le secteur D 1. Elles sont généralement groupées en 2 flots d'importance variable, localisés sous les somites (Pl. III, fig. A, B et C). Lorsque les uretères sont présents, les c.g.p. se répartissent à leur voisinage immédiat (Pl. III, fig. A et B).

St. 24	D 2	D 1	V	Total
F 6	0	12	30	42
F 11	7	22	34	63
E 5	10	7	15	33
E 10	6	0	44	50
E 18	0	4	19	23
I 5	1	32	0	33
I 10	0	27	18	45
I 25	14	33	2	49
I 30	0	18	0	18
I 35	0	21	20	41
L 10	1	0	33	34
L 15	0	15	35	50
L 20	0	31	23	54
S 3	0	22	0	22
S 6	1	18	25	44
S 10	1	8	16	25
S 13	0	44	4	48
S 16	0	32	4	36
S 22	0	24	0	24
Moyenne	3	20	17	40

Tableau 15 - Numérations gonocytaires réalisées après mise en culture des différents secteurs prélevés au stade du bourgeon caudal moyen (st. 24).

St. 26	V	D 1	D 2	Total
L 25	12	11	7	30
L 35	18	27	8	55
H 20	33	15	9	57
H 25	40	20	18	78
H 30	9	24	3	36
H 35	13	17	10	40
S A	3	58	3	64
S B	1	58	0	59
S C	0	32	0	32
S D	11	23	4	38
S E	15	16	3	34
S F	7	21	0	28
S G	9	46	2	57
S I	4	28	0	32
Moyenne	13	28	5	46

Tableau 16 - Numérations gonocytaires réalisées après mise en culture des différents secteurs prélevés au stade du bourgeon caudal âgé (st. 26).



Le secteur ventral constitué originellement et en majeure partie d'endoblaste évolue en une vésicule plurilobée dont l'aspect rappelle énormément les prestations obtenues après culture des secteurs ventraux (secteurs 1) définis aux stades 21 et 22 (Pl. II, fig. F). Seule modification, l'absence de réaction caudale, ce qui est tout à fait normal vu la nature des tissus prélevés. Des gonocytes y ont été dénombrés, ils se localisent préférentiellement au sein des nombreuses travées mésenchymateuses qui sillonnent la prestation (Pl. III, fig. D et E).

Le tableau 15 rend compte de la répartition des c.g.p. décelées dans les différents secteurs mis en culture.

Le secteur D 1 renferme le plus grand nombre de c.g.p. ($m = 20$) suivi de peu par le secteur ventral (secteur V, $m = 17$). Le secteur D 2 est peu colonisé (8 cas positifs sur les 19 étudiés). Le nombre de c.g.p. rencontrées semble faible, cette remarque rejoint nos précédentes constatations. Le déficit observé (la moyenne chez les individus témoins non opérés s'élevait à 96) résulte probablement des conditions inhérentes à l'opération. Les valeurs rapportées dans le tableau 15 confirment la colonisation du mésoderme intermédiaire.

- Stade 26
.....

Le protocole opératoire reste le même, les prestations obtenues après mise en culture des secteurs D 1, D 2 et V ressemblent à celles décrites précédemment. Les résultats des numérations sont rassemblés dans le tableau 16. Le secteur ventral révèle un nombre moyen de c.g.p. proche de celui rencontré au stade 24, le léger déficit observé n'étant pas significatif.

De même la différence constatée entre les moyennes des secteurs D 1 (20 au st. 24 et 28 au st. 26) ne traduit pas une progression en direction dorsale des c.g.p. ($d = 8$, $t = 0,05$. $Sd = 9,32$), la différence constatée est inférieure à l'écart standard de la différence, elle n'est pas significative.

Le secteur D 2, par contre, voit son degré d'attraction s'affirmer. Si la moyenne enregistrée reste faible ($m = 5$), il est maintenant colonisé dans 10 cas sur 14. Au stade 26, le mésoderme intermédiaire renferme effectivement des c.g.p.

En conclusion, tous ces résultats confirment et précisent les constatations que nous avons émises après les ablations unilatérales réalisées aux divers stades du bourgeon caudal. Les numérations effectuées montrent de manière claire le déplacement progressif des c.g.p. vers les crêtes génitales



	Neurula				Bourgeon caudal		
	st. 15	st. 17	st. 19-20	st. 21	st. 22	st. 23-24	st. 25, 26 et 27
Mésoderme ventral	+++	+	++	++	0		
Mésoderme latéro-ventral					0	0	0
Mésoderme latéral				0	+++	0	0
Mésoderme intermédiaire						+++	+++

Tableau 17 - Localisation des c.g.p. du stade 15 au stade 27 ; +++ : important ; ++ : moyen ; + : faible ; 0 : nul. La représentation schématique de cette localisation (———) fait apparaître le passage de ces cellules du mésoderme ventral au mésoderme intermédiaire au stade 22.

au sein du mésoderme intermédiaire. Cette migration débute à la fin du stade 21 et ne se termine qu'au stade 26. A ce stade les cellules semblent en place au niveau des futures crêtes génitales. Le tableau 17 représente le chemin parcouru par les éléments germinaux au cours de la neurulation et des stades du bourgeon caudal.

CHAPITRE II

LOCALISATION DES C.G.P. AU COURS DE LA GASTRULATION

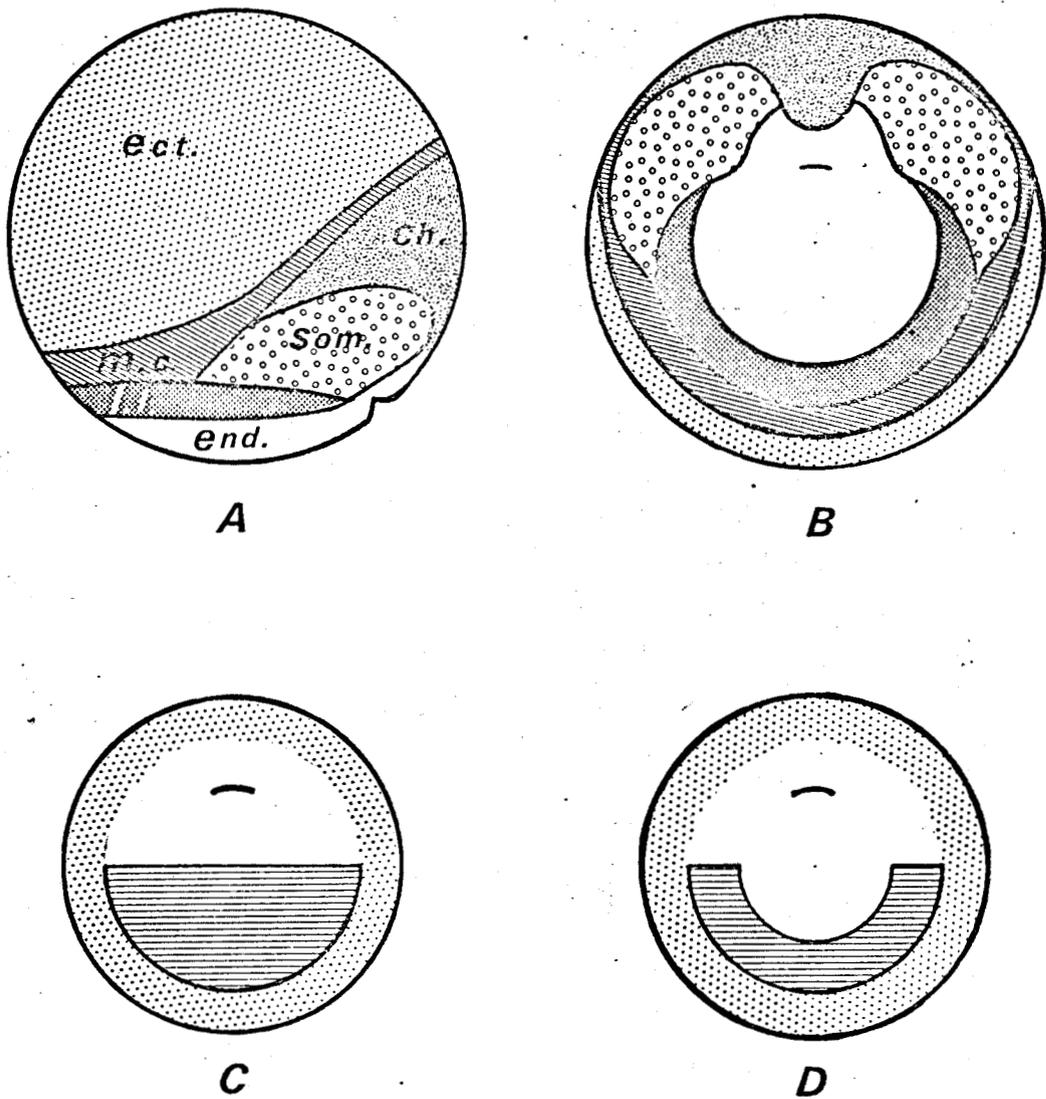


Fig. 6 - A et B : Carte des ébauches présomptives chez le Triton (d'après VOGT, 1929 et PASTEELS, 1942).

Ect, ectoblaste ; Ch, chordo-mésoblaste ; Mc, mésoblaste caudal ; Som, somites ; ll, lames latérales ; End, endoblaste.

C et D : Représentation des 2 types de secteurs isolés et mis en culture.

Nous avons montré dans le 1er chapitre que les cellules primordiales germinales de Pleurodèle étaient capables de se différencier à partir de certains tissus isolés et mis en culture aux stades de la neurula et du bourgeon caudal. Cette technique s'étant révélée efficace pour localiser avec précision ces cellules au cours des premiers stades de l'organogenèse, nous l'avons utilisée pour étudier leur répartition pendant la gastrulation. Ces mêmes résultats laissent supposer que les c.g.p. sont situées précocement dans le feuillet mésodermique, c'est donc ce dernier qui a fait l'objet de la suite de notre travail.

I - EXPLANTATION IN VITRO

A - CULTURE IN VITRO GLOBALE

1 - Protocole opératoire

Nous avons réalisé l'ablation élective de fragments de gastrulas prélevés aux stades 8 a, 9 et 10 ; stades caractéristiques de cette période charnière du développement embryonnaire. Les territoires isolés sont mis en culture en salière suivant la technique relatée au début de ce mémoire. Deux protocoles opératoires ont été suivis :

- Dans un premier temps, nous nous sommes contentés de découper, comme l'indique la figure 6 c, un quartier relativement important situé au voisinage du pôle végétatif du germe. Ce fragment renferme ainsi la totalité de la couronne du mésoderme intermédiaire présomptif. A l'issue de 2 incisions successives nous éliminons les secteurs limitrophes ectodermiques puis la masse vitelline est détachée de l'explant.

Le territoire ainsi isolé affecte la forme d'un quartier comportant les territoires présomptifs du mésoblaste latéral somitique et caudal et de l'endoblaste ventral. Ces territoires sont supposés correspondre à ceux définis par VOGT (1929) et PASTEELS (1942) lors de l'établissement de la carte des territoires présomptifs chez les Urodèles (Fig. 6 a et b).

- Dans un second temps, nous nous sommes efforcés d'éliminer le plus possible la masse vitelline de façon à ne conserver que la seule couronne de mésoblaste latéral présomptif (Fig. 6 d). Il faut signaler qu'au stade 8 a, stade marqué par l'apparition de l'encoche de la lèvre dorsale du blastopore, la séparation endoblaste et mésoblaste n'est pas aisée, ces deux feuillets adhèrent fortement l'un à l'autre et leur délimitation précise à la surface du germe est difficile.

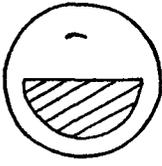
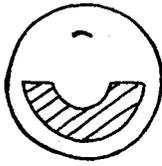
Séries opératoires		St. 8 a			St. 9			St. 10			Total		
		N	≠	+	N	≠	+	N	≠	+	N	≠	+
	Série B	10	7	1	4	1					14	8	1
	Série G	10	6	5	5	4	3				15	10	8
	Série I	9	1		4	3	1	10	5	3	23	9	4
	Série K				15	9	1	1			16	9	1
	Série Q	19	8	1	4	2					23	10	1
	Série V	4	2	1	23	10					27	12	1
	Série W	10	3		5	2	1	1	1		16	6	1
Totaux											134	64	17

Tableau 18 - Culture in vitro globale.

N : Nombre d'opérations.

≠ : Nombre d'explants différenciés.

+



2 - Résultats

Le tableau 18 exprime les résultats enregistrés. Près de la moitié des explants se sont différenciés, 64 prestations ont pu être étudiées sur les 134 opérations réalisées. Les autres fragments mis en culture, se dissociant rapidement, n'ont pu être analysés.

a) Aspect macroscopique

Les prestations obtenues affectent la forme de vésicules ovoïdes, plus ou moins allongées et de taille très variable selon les séries opératoires effectuées. La planche IV représente les différents types observés.

Ces vésicules présentent parfois ^à l'une de leurs extrémités une réaction que nous avons qualifiée de type caudal (Pl. IV, fig. F).

Par transparence il nous a été permis, dans de nombreux cas, de discerner des travées sillonnant une vaste cavité occupant le centre de la vésicule (Pl. IV, fig. B, D, E et F). Une masse plus compacte se condense à l'un des pôles. Parfois une ébauche de membre se différencie (Pl. IV, fig. A). La vésicule est très souvent recouverte de quelques mélanophores notamment au voisinage de la réaction de type caudal (Pl. IV, fig. F).

b) Aspect microscopique

Deux degrés d'organisation peuvent être décrits liés au niveau de différenciation de l'explant :

- Le premier caractérise les vésicules de petite taille ; la richesse en granules vitellins affecte tous les tissus représentés. Un mésenchyme abondant renfermant un nombre important de types cellulaires occupe la totalité de la vésicule. La surcharge vitelline interdit toute détermination des éléments présents. De plus le comportement aberrant de certaines cellules traduit une différenciation incomplète ou anormale de l'explant. Parfois quelques tubules pronéphrétiques peuvent être discernés au sein de cet enchevêtrement. La pigmentation est toujours très prononcée.

- Le second, le plus intéressant, s'applique aux vésicules de grande taille. Les vésicules sont revêtues par un épithélium dont l'origine est parfois difficile à préciser, le plus souvent ectodermique, parfois mésodermique ou endodermique. Une grande cavité se creuse au sein de cette vésicule traversée par de fines travées mésenchymateuses où se différencient des tubules pronéphrétiques (Pl. V, fig. D et E), ces travées convergent vers la paroi épidermique. Un mésenchyme lâche borde cette cavité tapissant de ce fait

Séries opératoires	Stade	Numéro de l'opération	Nombre de c.g.p. décelées
Série B	8 a	B 6	7
Série G	9	G 4	9
	8 a	G 5	45
	8 a	G 7	11
	8 a	G 8	10
	8 a	G 11	10
	8 a	G 13	74
	9	G 14	26
	9	G 15	9
Série I	9	I 2	10
	10	I 9	2
	10	I 10	23
	10	I 23	9
Série K	9	K 5	1
Série Q	8 a	Q 16	8
Série V	8 a	V 24	4
Série W	9	W 16	2
Moyenne			16

Tableau 19 - Gonocytes dénombrés chez les cultures.



l'enveloppe vésiculaire (Pl. V, fig. A). On y rencontre de nombreux éléments cellulaires et en particulier des cellules pigmentaires et des grains de pigment souvent abondants au niveau des réactions de type caudal. De plus des cellules dont l'aspect rappelle les cellules ganglionnaires y sont parfois décelées.

Des cellules germinales primordiales ont été mises en évidence dans un petit nombre de cas, 17 sur 64 comme l'indique le tableau 18. Mis à part 2 cas isolés (G 5 = 45 et G 13 = 74), les valeurs relevées sont généralement faibles. Le tableau 19 montre que la moyenne des gonocytes dénombrés ne s'élève qu'à 16, nous sommes bien loin des chiffres rencontrés lors des numérations réalisées chez les individus témoins (la moyenne atteignait 96).

Il faut souligner que les valeurs les plus significatives ont été relevées après examen des prestations les plus volumineuses, c'est le cas notamment de la série G. On peut estimer que la différenciation complète des c.g.p. est liée au degré de différenciation de la totalité de l'explant.

Ces c.g.p., isolées ou regroupées en petits flots de quelques unités, s'observent fréquemment au voisinage des structures tubulaires pronéphrétiques (Pl. V, fig. D et E). On peut voir dans cette association privilégiée un signe d'attraction de la part des tubules pronéphrétiques. Dans d'autres cas, les c.g.p. se répartissent au sein même des travées mésenchymateuses (Pl. V, fig. B et F) ou, quand les flots sont importants, dans le mésenchyme entourant la cavité (Pl. V, fig. A et C). Notons une fois encore l'association constante des c.g.p. avec des éléments d'origine mésodermique.

D'une manière générale les fragments cultivés se sont différenciés conformément à leur valeur présomptive. Il reste toutefois à expliquer la présence de mélanophores et d'éléments neuroïdes, on peut invoquer une action neuralisante du milieu (BARTH, 1941 ; HOLTGRETER, 1944 , 1945) mais le problème devra être approfondi.

A la lecture du tableau 19 nous constatons que, mis à part la série G, peu de résultats significatifs ont été rencontrés ; cette série remarquable par l'ampleur de ses prestations semble être l'exception. La qualité de la ponte est-elle en cause ? Il est reconnu en effet que certaines pontes se prêtent mieux à certains types d'expérimentation. Dans le cas présent, il semble que cette technique de culture in vitro présente certaines insuffisances ; toutes les conditions ne semblent pas réunies pour assurer une différenciation normale et constante des fragments prélevés. Il n'en demeure pas moins que des c.g.p. ont été décelées et il était intéressant de limiter la taille des secteurs pour mieux cerner leur répartition au sein de la couronne mésodermique.

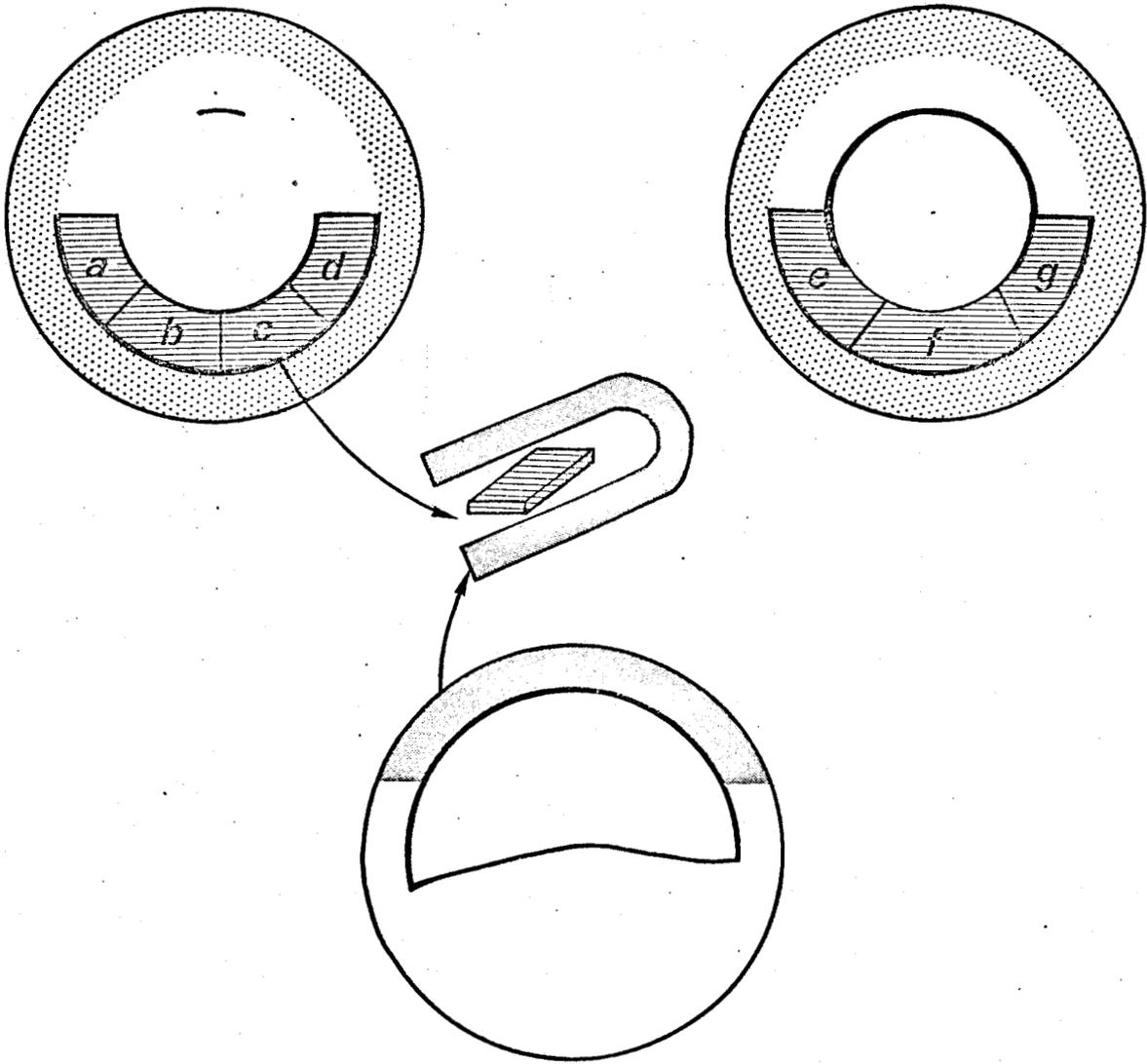


Fig. 7 - Représentation des différents secteurs (a, b, c et d) et (e, f et g) prélevés au niveau de la zone marginale ventrale et ventro-latérale et insérés dans un sac d'ectoblaste prélevé sur une blastula âgée.

Malheureusement toutes nos tentatives ont échoué, les explants se dissociant en cours de culture. La taille du fragment semble constituer un facteur limitant pour ce type de culture in vitro. Afin de surmonter ces difficultés nous nous sommes orientés vers la technique de culture en sandwich (HOLTFRETER, 1933), technique qui devait pensions-nous réduire les risques de dissociation.

B - CULTURE EN SANDWICH

1 - Protocole opératoire

La couronne de mésoderme latéral présomptif, isolée comme précédemment, est découpée en 3 ou 4 secteurs de taille identique. Chaque secteur ainsi défini est inséré dans une tranche d'ectoblaste prélevée sur un autre germe dont le stade (blastula âgée) a été choisi en vertu de ses aptitudes à recouvrir rapidement le fragment. Dans les 2 dernières séries expérimentales, nous ajoutons de l'endoblaste (présumé fournir de l'intestin postérieur) prélevé sur des germes de stade équivalent. La figure 7 retrace le protocole opératoire employé. Les sandwichs ainsi constitués sont mis en culture selon la technique déjà relatée.

2 - Résultats

De manière générale, les explants se sont comportés de façon beaucoup plus satisfaisante ; la fréquence de dissociation s'étant fortement réduite (tableau 20). L'enveloppe ectodermique semble donc jouer un rôle protecteur et favoriser la différenciation des tissus mis en culture.

Les prestations obtenues ressemblent à celles décrites précédemment. Les vésicules sont toutefois plus petites et leur pigmentation est plus accusée. L'examen histologique ne révèle pas de différences fondamentales, il faut signaler cependant la présence, en certains points du mésenchyme remplissant la vésicule, d'amas cellulaires assimilables à des structures nerveuses peu organisées, souvent associées à des cellules pigmentaires.

A première vue, ces formations, d'importance d'ailleurs très inégale, ne peuvent manquer de surprendre étant donné la nature présomptive des tissus en présence. 2 possibilités peuvent être considérées :

- au stade blastula âgée il n'existe, chez le Pleurodèle, aucun point de repère précis (absence de croissant dépigmenté) permettant de déterminer le futur plan de symétrie de l'embryon.

On peut concevoir qu'une partie du champ cordo-mésodermique

Séries opératoires	St. 8 a		St. 9		St. 10		TOTAL		
	N	≠	N	≠	N	≠	N	≠	+
a) Sans endoblaste									
Série N	24	20					24	20	2
Série O	2	2	10	4	12	7	24	13	0
Série P	2	1			10	5	12	6	0
Série R					16	8	16	8	0
Série T			26	21			26	21	3
Série U	12	7					12	7	4
Totaux							114	75	9

b) Avec endoblaste							N	≠	+
Série V	21	17					21	17	8
Série W	24	23					24	23	1
Totaux							45	40	9

Tableau 20 - Culture in vitro en sandwich.

a : sans endoblaste

b : avec endoblaste.

N : Nombre d'opérations.

≠ : Nombre d'explants différenciés.

+ : Nombre de cas où les c.g.p. sont présentes.



puisse être prélevée en même temps que l'ectoblaste destiné à la formation des sandwichs. Les cellules nerveuses et pigmentaires présentes dans nos cultures résulteraient d'une interaction inductrice entre ces 2 tissus. Dans une telle hypothèse le cordo-mésoblaste, que l'on sait déterminé, devrait se différencier en corde dont nous n'avons jamais trouvé trace.

- la seconde interprétation a été envisagée au paragraphe précédent et met en cause des phénomènes d'auto-neuralisation en liaison avec des conditions de culture défavorables.

a) Culture sans endoblaste

Des c.g.p. ont été décelées, mais le tableau 20 a qui rassemble les résultats obtenus ne révèle que quelques cas significatifs. Sur les 114 opérations réalisées aux différents stades de la gastrulation, 75 prestations ont pu être analysées mais seulement 9 d'entre elles renfermaient des c.g.p. parfaitement reconnaissables. Le tableau 21 a rassemble les résultats des numérations, elles sont généralement faibles ($m = 17$). Dans 6 cas sur 9 elles sont inférieures à 10. Deux cas font exception ($N 14 = 42$, $U 22 = 67$), ils appartiennent à 2 séries expérimentales différentes. Dans 3 séries (O, P et R) il n'a été relevé aucune c.g.p. Tous les résultats montrent une grande variabilité numérique d'une série à l'autre. Les gonocytes mis en évidence n'occupent pas de secteur privilégié.

b) Culture avec endoblaste

Après analyse des résultats enregistrés au cours des 6 premières séries opératoires (N à U), nous nous sommes demandés si l'apport d'endoblaste ne favoriserait pas la différenciation des éléments germinaux. NIEUWKOOP (1946), à la suite de ses nombreux travaux expérimentaux, soulignait en effet l'influence prépondérante jouée par l'endoblaste dorso-caudal ; selon cet auteur les c.g.p. reçoivent une induction stimulatrice qui émane de cette portion endodermique.

L'endoblaste est prélevé dans la région qui, au cours du déroulement normal de la gastrulation, est susceptible d'exercer cette activité. Les fragments endodermiques sont donc prélevés dans la zone limitrophe de la future lèvre ventrale. L'examen des cultures montre que l'endoblaste associé au mésoderme présomptif ne se différencie jamais en tube digestif. Le vitellus ne se résorbe que partiellement, emprisonné au sein de l'une des travées mésenchymateuses qui sillonnent la cavité vésiculaire.

2 séries sont ainsi réalisées (tableau 20 b) : dans la série V,

a) Sans endoblaste			b) Avec endoblaste .		
Numéro de l'opération	Nature du secteur	Nombre de c.g.p. décelées	Numéro de l'opération	Nature du secteur	Nombre de c.g.p. décelées
N 14	e	42	V 4	a	9
N 24	f	5	V 5	b	5
T 4	e	2	V 6	c	16
T 12	e	7	V 8	a	13
T 20	f	9	V 10	c	3
U 1	e	12	V 26	a	59
U 13	e	3	V 28	c	17
U 21	g	7	V 29	d	6
U 22	f	67	W 1	b	33
Moyenne		17	Moyenne		12

Tableau 21 - Répartition des c.g.p. décelées dans les prestations obtenues après mise en culture en sandwich.

- a) sans endoblaste
b) avec endoblaste.



8 prestations sur 17 renferment effectivement des c.g.p. en nombre réduit, mais les résultats étaient encourageants. La seconde série W, réalisée dans les mêmes conditions, ne confirme pas la précédente. Sur les 23 cas étudiés, 1 seul renferme des c.g.p. (W 1 avec 33 c.g.p.). Cette série était pourtant remarquable car 1 explant seulement s'était dissocié en cours de culture. L'apport d'endoblaste ne semble pas modifier considérablement nos résultats, les valeurs numériques reportées dans le tableau 21 (a et b) sont voisines et les moyennes très proches l'une de l'autre.

C - DISCUSSION

La comparaison des résultats obtenus après mise en culture in vitro globale ou en sandwich révèle de profondes similitudes. Dans les 2 cas, le territoire mésodermique isolé, quand il se différencie évolue conformément à sa valeur présomptive. Il est donc déterminé dès le stade 8 a pour fournir les structures correspondantes : tubules pronéphrétiques, éléments variés du mésenchyme et parfois des parois coelomiques. L'évolution de l'endoderme constitue un cas particulier.

Des c.g.p. ont pu être mises en évidence et ce malgré le nombre restreint de cas réellement significatifs. Leur association constante avec les structures précitées prouve leur origine mésodermique. Nous devons signaler l'absence complète de cellules sanguines dans les prestations obtenues.

En conclusion, les techniques de culture in vitro utilisées pour déceler des c.g.p. dans le mésoderme latéral présomptif à différents stades de la gastrulation ne nous ont pas apporté tous les résultats espérés. Le milieu physiologique utilisé qui s'était avéré efficace aux stades de la neurulation et du bourgeon caudal semble beaucoup moins favorable à la différenciation d'explants isolés à des stades plus jeunes. Les résultats restent aléatoires, variant considérablement d'une série à l'autre.

Si les phénomènes de dissociation ont pu être limités par l'insertion du secteur mésoblastique dans une enveloppe ectoblastique ; cette technique n'améliore pas, sauf exception, la fréquence de différenciation des c.g.p.. Elle nous a permis néanmoins de cultiver de plus petits fragments ce qui était indispensable pour préciser la localisation des c.g.p.. L'apport d'endoblaste caudal présomptif ne semble pas modifier considérablement la différenciation des c.g.p. ; celui-ci était d'ailleurs en partie présent dans les premières séries expérimentales, en bordure du vaste secteur cultivé in vitro (séries B, G et I du tableau 18).

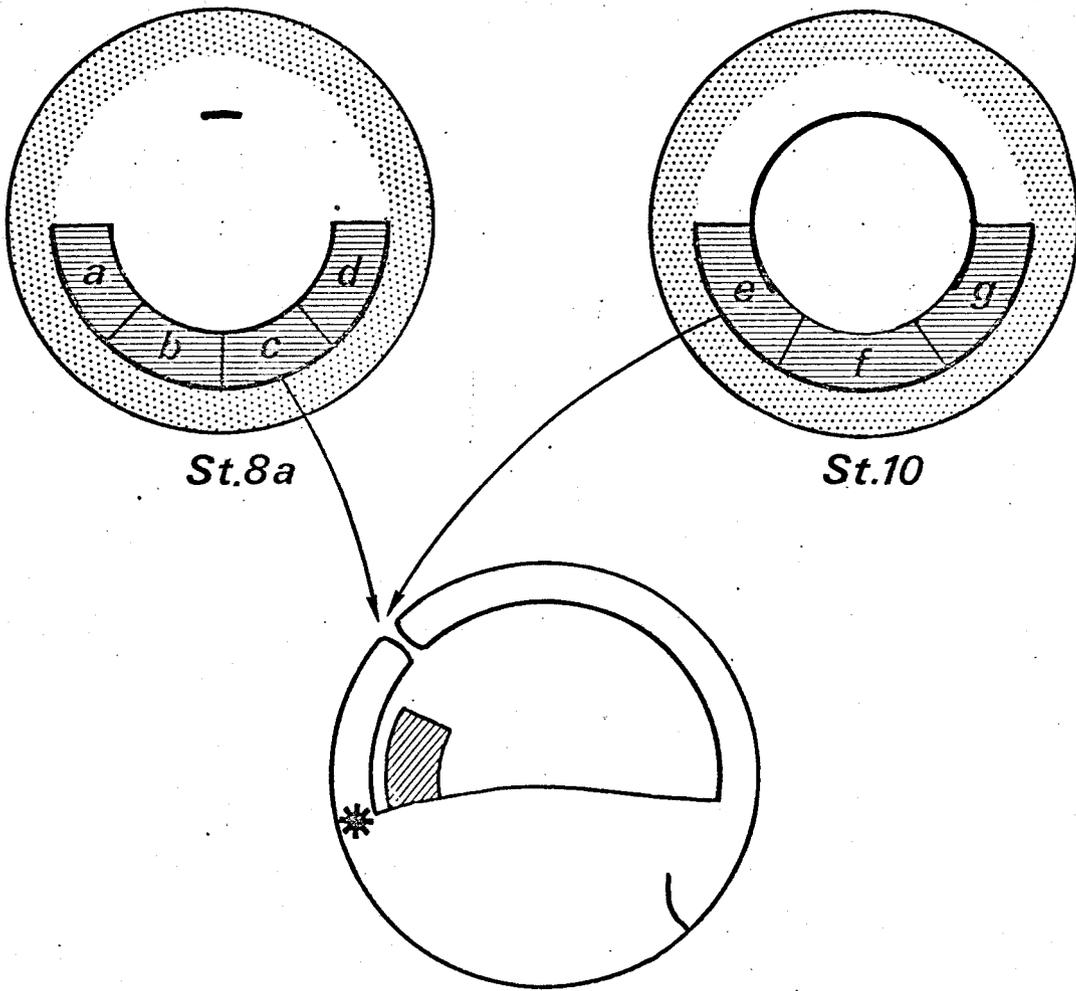


Fig. 8 - Représentation des différents secteurs (a, b, c et d) et (e, f et g) prélevés au niveau de la zone marginale ventrale et ventro-latérale et implantés dans le blastocèle d'une gastrula. * Localisation des c.g.p. de l'hôte.

Nous nous sommes alors efforcés de rechercher une technique qui permettrait une meilleure différenciation des c.g.p.. Nous savons que la gastrulation constitue une étape capitale dans le développement embryonnaire, les territoires endoblastiques et mésoblastiques, primitivement situés en surface, vont pénétrer progressivement à l'intérieur du germe. Le mésoderme présomptif des lames latérales, territoire supposé contenir les c.g.p., va donc être soumis à de multiples influences émanant des tissus environnants. Il nous a donc semblé que l'implantation de ce territoire dans le blastocèle d'une jeune gastrula ("Einsteckmethode" de par son origine, MANGOLD et SPEMANN, 1927) fournirait les conditions les plus favorables pour la mise en évidence d'éventuelles c.g.p..

II - EXPLANTATION IN VIVO : IMPLANTATION DANS LE BLASTOCELE

A - PROTOCOLE OPERATOIRE

2 types d'opérations ont été réalisés aux stades 8 a, 9 et 10.

Dans le premier type, la zone marginale ventrale et ventro-latérale est découpée en 4 secteurs équivalents a, b, c et d (Fig. 8 a).

Dans le second type, la zone présomptive du mésoderme latéral n'est segmentée qu'en 3 secteurs e, f et g (Fig. 8 b).

Ces différents secteurs correspondent à ceux définis dans le paragraphe précédent relatif à la culture in vitro en sandwich. Chaque fragment ainsi délimité est introduit dans le blastocèle d'une jeune gastrula comme l'indique la Fig. 8.

B - RESULTATS

Les individus receveurs ainsi traités se développent dans de très bonnes conditions. Le secteur mésodermique greffé ne perturbe pas l'embryogenèse de l'hôte, la gastrulation et la neurulation se déroulent normalement.

Quelque soit le type d'opération réalisé, le fragment implanté se localise généralement dans la région moyenne du tronc en formant des excroissances en position plus ou moins ventrale. Néanmoins nous avons observé quelques cas de réactions affectant la région céphalique. L'emplacement des réactions traduit en fait le lieu d'implantation du fragment lors de son introduction dans le blastocèle. La planche VI illustre les principales prestations obtenues.

N° d'opération	Secteurs implantés				1/2 gauche (a + b)	1/2 droite (c + d)	Total	Secteurs avec flots sanguins	
	a	b	c	d					
Stade 8 a									
Série III									
A	37	17	8	24	54	32	86		c
B	27	44	-	-	71	-	-		
C	25	60	21	66	85	87	172		
D	44	23	-	-	67	-	-	a	d
E	0	61	8	28	61	36	97	a	d
F	35	40	40	49	75	89	164	a b	d
H	13	2	-	-	15	-	-	a	
Série IV									
F	5	45	29	19	50	48	98	a b c	
Série V									
A	30	18	-	-	48	-	-	a b	
Série VI									
A	+	53	54	0	-	54	-		c
E	0	20	-	-	20	-	-		
Stade 9									
Série I									
A	36	10	6	20	46	26	72		
C	0	12	24	9	12	33	45	a	c
D	0	45	-	-	45	-	-	a	
E	27	48	+	0	75	-	-	a b	
F	12	20	-	-	32	-	-		
Série II									
C	-	-	2	22	-	24	-		c
Série III									
G	38	28	-	-	66	-	-		b
Série V									
B	-	-	0	0	-	0	-		
Série VI									
B	10	68	0	0	78	0	78	a b	
C	0	40	9	63	40	72	112		c
Série I									
B	0	17	5	40	17	45	62		c d
Stade 10									
Série I									
G	34	0	14	18	34	32	66	a b	
Série II									
A	48	+	0	13	-	13	-	a	c d
F	+	0	0	0	-	0	-	a	b c
G	0	13	13	63	13	80	93	a	
H	5	33	0	0	43	0	43	a	
I	0	+	0	12	-	12	-		
Série V									
C	0	0	0	0	0	0	0		b c
D	0	12	60	4	12	64	76		c

Tableau 22 - Genocytes dénombrés chez les larves opérées.

- : Opération non réalisée en raison de difficultés techniques.

+ : Animaux morts au cours de l'élevage.



L'importance de ces formations varie considérablement d'un individu à l'autre et ne semble pas liée à la nature du secteur isolé. L'examen histologique révèle qu'au niveau de ces réactions les lames latérales présentent diverses anomalies : dédoublement, épaissement, formation d'un mésentère ventral. Fréquemment, le fragment mésodermique implanté se différencie en éléments mésenchymateux. Contrairement aux expériences réalisées précédemment (culture in vitro) nous constatons l'absence de structures tubulaires d'origine pronéphrétique. Par contre, des flots sanguins volumineux apparaissent souvent au voisinage de la réaction (Pl. VII, fig. E). Ces flots n'intéressent pas de secteur précis (tableaux 22 et 23). L'intestin émet parfois des digitations plus ou moins spectaculaires qui peuvent entrer en contact avec l'épiderme et s'ouvrir à l'extérieur (Pl. VII, fig. E).

Enfin au niveau des structures mésodermiques se situent presque constamment les éléments que nous recherchions, c'est-à-dire les c.g.p.. Elles forment le plus souvent un amas unique d'importance variable localisé dans l'un des 3 sites suivants :

- la splanchnopleure, contre l'intestin ; c'est le cas le plus fréquent, l'flot faisant saillie dans la cavité coelomique (Pl. VII, fig. A et B).
- un mésentère ventral, résultant de la fusion des 2 lames latérales (Pl. VII, fig. D).
- plus rarement, la somatopleure, sous l'épiderme (Pl. VII, fig. C).

Cette localisation avec la somatopleure ou la splanchnopleure est conforme à la nature présomptive du territoire dont elles dérivent. Ces résultats démontrent clairement l'origine mésodermique de ces cellules.

L'efficacité de l'intervention n'est pas nécessairement liée à une réaction spectaculaire de l'hôte. Dans de nombreux cas, seul un examen histologique attentif a permis de localiser l'flot gonocytaire surnuméraire qui est alors enveloppé dans la somatopleure ou la splanchnopleure de l'hôte. Nos résultats démontrent donc que les c.g.p. sont situées au sein du mésoderme latéral présomptif de la gastrula et ceci dès le stade 8 a.

La répartition des c.g.p. au sein du mésoderme latéral présomptif semble inégale, c'est ce qu'exprime le tableau 22 où sont rassemblés les résultats. Les valeurs rencontrées varient énormément d'un secteur à l'autre. Dans la plupart des cas où les 4 secteurs d'un même donneur ont pu être transplantés et analysés on observe même une répartition disproportionnée entre les moitiés droite et gauche.

Signalons les cas extrêmes où aucune c.g.p. n'a pu être décelée dans

N° de l'opération	e	f	g	Total	Secteurs avec I. Sg.
<u>St. 8 a</u>					
Série IV					
C	0	80	8	88	
E	11	68	-	-	f
G	0	57	25	82	
Série VII					
A	8	-	58	-	g
B	65	0	0	65	g
C	0	0	56	56	e
Série X					
B	67	5	0	72	e f
E	4	40	33	77	
<u>St. 9</u>					
Série IV					
D	30	90	0	120	
H	-	20	0	-	
Série VI					
D	0	90	-	-	f
Série VIII					
A	-	42	0	-	
B	0	0	0	-	f
C	58	0	12	70	
Série X					
A	19	29	-	-	
C	54	-	12	-	e
F	-	0	0	-	
G	0	32	70	102	f
H	-	72	10	-	f g
I	72	25	0	97	e f
J	55	0	73	128	
K	0	0	61	61	g
L	0	22	90	112	e g



Tableau 23 - Gonocytes dénombrés chez les larves opérées.

- : opération non réalisée en raison de difficultés techniques.

la moitié droite (Série VI, Bc et Bd ; série II, Hc et Hd par exemple).

Les résultats enregistrés après implantation des 3 secteurs e, f et g confirment ces faits, les c.g.p. sont dispersées dans l'ensemble du mésoderme latéral (tableau 23). Aucune convergence de ces cellules vers les secteurs les plus ventraux (b et c) ne se manifeste entre le début et la fin de la gastrulation (st. 8 a à 10). Dans 27 cas, on a pu transplanter avec succès la totalité du mésoderme latéral présomptif d'une même gastrula. La moyenne des totaux des c.g.p. dénombrées dans ces 27 opérations s'élève à 93. Cette valeur est sensiblement identique à celle enregistrée dans les crêtes génitales des larves témoins (96, tableau 1). Ces chiffres, très voisins l'un de l'autre, indiquent que la quasi totalité des c.g.p. de la jeune gastrula ont été affectées par l'intervention et qu'elles se situent effectivement dans ce mésoderme latéral.

Les cellules germinales surnuméraires des larves opérées se localisent toujours au sein des structures issues des lames latérales sous la forme d'îlot bien individualisé ; leur association constante avec la somatopleure ou la splanchnopleure est conforme à la nature présomptive du territoire dont elles dérivent. Ceci montre que les c.g.p., présentes dans un secteur, se différencient sur le lieu même de son implantation dans le blastocèle et échappent à toute influence attractive provenant de l'hôte. Corrélativement nous n'avons constaté aucune anomalie dans le nombre et la répartition des gonocytes au niveau des crêtes génitales normales des larves opérées. Il ne se manifeste donc aucune interaction entre les c.g.p. apportées expérimentalement et celles de l'hôte, et ceci en dépit de leur proximité au moment de l'opération (Fig. 8).

CHAPITRE III

ETUDE PRELIMINAIRE SUR LES CONDITIONS DE DETERMINATION
DES C.G.P. AUX STADES GASTRULA ET NEURULA

Les différentes techniques opératoires utilisées pour l'étude expérimentale de la gastrulation ont apporté la preuve que les c.g.p. se localisent dans le mésoderme latéral présomptif. Les difficultés rencontrées pour les mettre en évidence nous ont permis d'aborder les problèmes relatifs à leur détermination et à leur différenciation.

Ces recherches ne constituent qu'une étape préliminaire à une étude plus complète qui devra être réalisée ultérieurement.

Nos résultats, comme ceux de la plupart des autres auteurs, sont en faveur d'une détermination précoce des c.g.p. chez les Amphibiens. Chez le Pleurodèle, nous avons obtenu la différenciation de ces cellules après culture in vitro de mésoderme latéral de la jeune gastrula (st. 8 a) ; mais seulement dans un nombre très limité de cas par rapport à la quantité de tentatives entreprises. Comme nous l'avons déjà souligné, cet échec partiel peut être imputé à une déficience du milieu de culture. Mais à la suite des nombreux travaux de NIEUWKOOP en ce domaine (1946), une autre hypothèse peut être avancée. Selon lui, chez les Urodèles, les c.g.p. existent bien au sein du mésoderme latéral mais dans un état prédéterminé et leur différenciation ne peut intervenir que sous l'influence d'une action inductrice émanant de l'endoderme dorso-caudal qui vient en contact avec la région germinale des lames latérales au cours de l'invagination gastruléenne.

La technique d'implantation dans le blastocèle ne peut fournir aucune indication utile en ce domaine puisqu'en définitive le fragment implanté est amené à se différencier au contact de l'endoderme comme le montrent les coupes histologiques (Pl. VII, fig. A et B). Afin de mettre en évidence cette éventuelle action stimulatrice de l'endoblaste, suggérée par NIEUWKOOP, nous avons imaginé de transplanter le territoire des lames latérales dans la région dorsale de bourgeons caudaux.

Les greffons, que nous savons contenir des c.g.p., sont prélevés sur de jeunes gastrulas donc avant tout contact avec l'endoderme. Outre le fait que les individus receveurs sont nettement plus âgés que les tissus greffés, le site choisi présente l'avantage de ne présenter aucune relation directe avec la masse endoblastique de l'hôte. Il échappe donc à priori à toute action pouvant émaner de l'endoblaste.

Dans un premier temps, il était nécessaire de s'assurer de la capacité de différenciation d'éléments germinaux sur un tel lieu, c'est pourquoi nous avons réalisé des transplantations de mésoderme latéral présomptif prélevé unilatéralement sur de jeunes neurulas. Les cultures effectuées précédemment nous ayant révélé leur détermination effective à ce stade.

I - PROTOCOLE OPERATOIRE

Les germes donneurs sont choisis parmi des individus ayant atteint le stade gastrula (st. 8 a et 9) et le stade neurula (st. 15 à 18). Les germes receveurs, plus âgés, sont parvenus au stade du bourgeon caudal (st. 24 et 26). La figure 9 représente le protocole expérimental suivi.

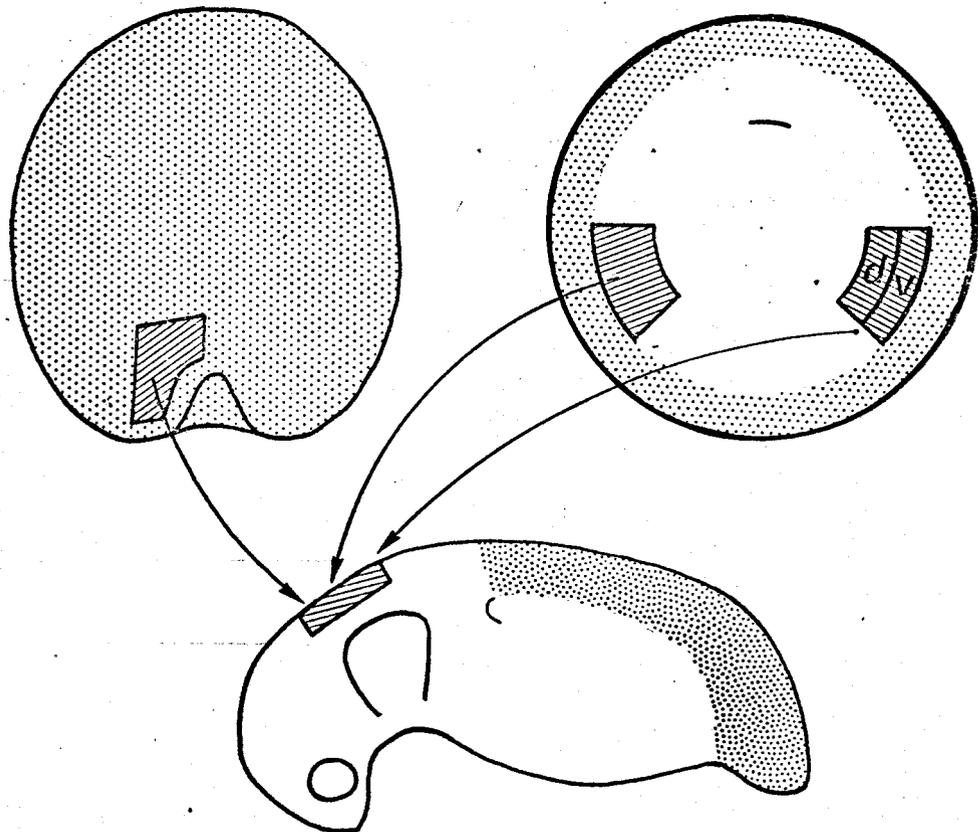


Fig. 9 - Représentation des différents secteurs prélevés aux divers stades de la gastrulation et de la neurulation et transplantés sur des bourgeons caudaux en position dorsale. Le fragment découpé dans la zone marginale ventro-latérale de la jeune gastrula est divisé en 2 secteurs un dorsal (d) et un ventral (v).

Un petit volet ectodermique est découpé sur le receveur, juste en arrière de la tête, cette incision découvre le tube nerveux sur lequel sera appliqué le greffon. La cicatrisation est rapide et dans la majorité des cas l'intervention ne laisse pas de traces, le territoire transplanté s'intégrant parfaitement aux tissus de l'hôte.

	Numéro de l'opération	Cloaque	c.g.p.	Muscles	Costes	Lames latérales	
Série 1	1	x	22	x		x	
	2	x	12	x		x	
	4						
	5	x	3	x			
	7		18			x	
	8	x	40	x		x	
	9	x	16		x	x	
	10	x	15	x	x	x	
	Série 2	1		6			
		2				x	
3				x	x	x	
4						x	
5					x	x	
6				x	x	x	
7						x	
8			17	x	x		
9			3				
10							

Tableau 24 - Greffe d'ecto-mésoderme de neurula.

présence absence



II - RESULTATS

A - TRANSPLANTATION DE TERRITOIRE ECTO-MESODERMIQUE DE NEURULA

2 séries expérimentales ont été effectuées et les résultats rassemblés dans le tableau 24. L'examen histologique réalisé chez les individus opérés révèle la présence au niveau de la réaction, de nombreux éléments d'origine mésodermique. Ces formations se localisent en position dorsale au dessus même du tube nerveux, celui-ci présente parfois des excroissances vraisemblablement causées par l'opération. La planche VIII (fig. A, B, C et D) illustre les structures rencontrées.

Le tableau 24 rend compte de la fréquence des formations observées : hématies, lames latérales (Pl. VIII, fig. A, C et D) et muscles (Pl. VIII, fig. C) sont conformes à la nature du territoire greffé. Nous avons décelé des c.g.p. dans 10 cas sur 18 ; celles-ci se répartissent en flots d'importance inégale se localisant dans le mésenchyme (Pl. VIII, fig. B) ou sur le bord d'une lame latérale (Pl. VIII, fig. A, C et D).

On peut s'étonner de constater la présence, dans la première série expérimentale, d'une structure de type digestif dont nous n'avons jamais trouvé d'homologue dans les autres types d'expériences et en particulier dans les cultures de neurula. Cette différenciation peut surprendre car au stade neurula le feuillet ecto-mésodermique se détache parfaitement de la masse endoblastique, sur laquelle il repose. La simple observation histologique ne permet pas d'identifier avec certitude ces structures et l'on peut estimer qu'elles correspondent au cloaque dérivé du territoire du proctodeum, conformément au schéma de la région caudale du Triton proposé par CHUANG (1947) et représenté sur la figure 10. L'absence de cette formation, remarquée dans la seconde série expérimentale, serait imputable au choix des germes utilisés. Les 2 séries opératoires sont réalisées sur des embryons de stades différents, de ce fait, on peut supposer que l'ébauche présomptive du proctodeum puisse échapper à l'ablation.

La différenciation des c.g.p. n'est pas liée à la présence de ces formations de type digestif car dans 4 cas des éléments germinaux ont été observés en absence de toute structure correspondante. Ces résultats confirment ceux obtenus après culture in vitro de la région ecto-mésodermique entourant le blastopore ; au stade neurula, les c.g.p. sont effectivement déterminées et capables d'autodifférenciation après implantation hétérotopique sur des individus plus âgés.

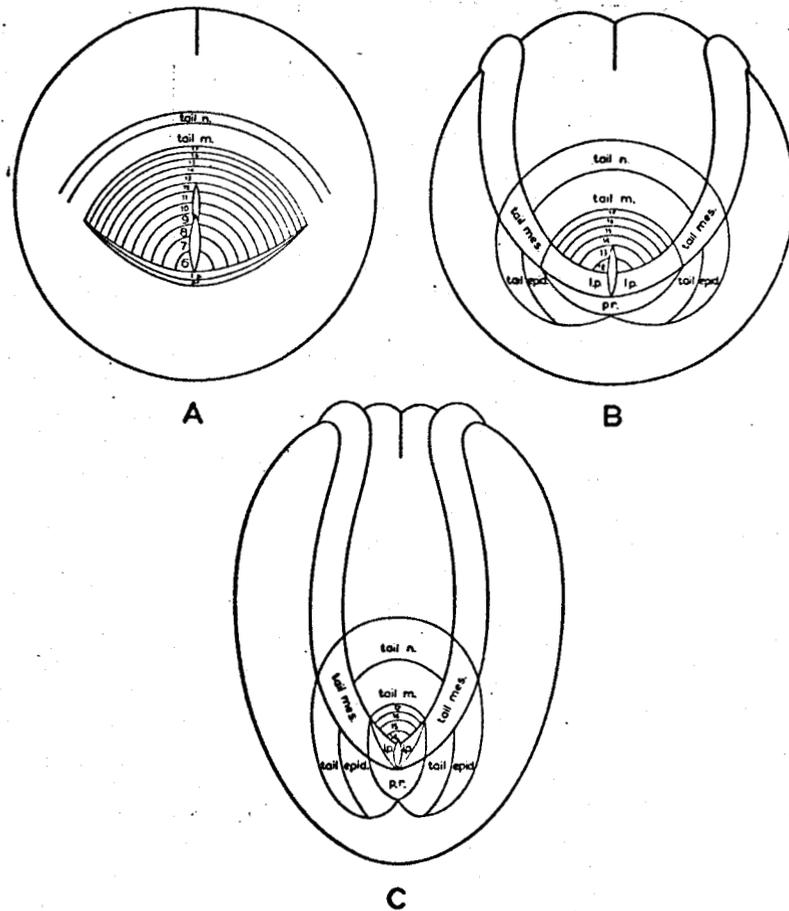


Fig. 10 - Schéma de la région caudale de la neurula de Triton, les aires présumptives sont représentées à 3 stades successifs du développement. lp, lame latérale ; pr, proctodeum ; tail epid., épiderme caudal ; tail mes., mésenchyme caudal ; tail n., neuroderme caudal. Les chiffres (6 à 17) indiquent l'ordre des somites (d'après CHUANG, 1947).

Numéro de l'opération	Néphrons	Cloaque	c.g.p.	Muscles	Hématies	Lames latérales
1	x			x		
2	x			x		
3				x		
4		?		x		
5				x		
6	x			x		
7	x	?		x		
8	x			x		
9	x			x	x	x

Tableau 25 - Greffe de mésoderme latéral présomptif de gastrula sur du bourgeon caudal en position dorsale.
? structure digestive atypique

présence absence

Numéro de l'opération	Sec:teur	Néphrons	Cloaque	c.g.p.	Muscles	Hématies	Lames latérales
1	d						
	v	x	?	18		x	x
2	d				x		
	v	x		18		x	x
3	d				x		
	v	x		10			x
4	d						
	v						
5	d	x			x		
	v	x	?		x	x	x
6	d	x					
	v						
7	d	x					x
	v	x		12		x	x
8	d	x					x
	v	x					

Tableau 26 - Greffe de mésoderme latéral présomptif de gastrula sur du bourgeon caudal en position dorsale.
? structure digestive atypique.

d, dorsal ; v, ventral.

présence absence

Les valeurs exprimées dans le tableau 24 sont relativement basses et varient considérablement d'un individu à l'autre. Les écarts enregistrés (3 à 40) s'expliquent aisément, ils traduisent les limites propres à ce type d'opération. L'ablation unilatérale, réalisée sur la jeune neurula, respecte le bord de la fente blastoporale. On ne peut assurer que toutes les c.g.p. situées dans le feuillet mésodermique aient été prélevées et transplantées sur le germe receveur.

B - TRANSPLANTATION DE TERRITOIRE MESODERMIQUE DE GASTRULA

2 séries expérimentales ont été réalisées. Dans la seconde série nous avons partagé le fragment, initialement découpé dans le mésoderme latéral présomptif, en 2 secteurs : l'un dorsal (d) et l'autre ventral (v) conformément à la figure 9. Ce nouveau protocole opératoire pouvant se révéler précieux pour compléter les travaux précédemment effectués pour mettre en évidence les c.g.p. au cours de la gastrulation. Les territoires ainsi délimités et isolés sont greffés en position dorsale sur les bourgeons caudaux.

Les tableaux 25 et 26 rassemblent les résultats obtenus. En plus des structures déjà décrites précédemment, hématies, lames latérales et éléments musculaires, nous notons la présence de tubules pronéphrétiques qui caractérisent la différenciation du secteur transplanté. Nous n'avons jamais observé de structure typique qui puisse être assimilée à une portion du tube digestif. Des c.g.p. ont été décelées dans la seconde série expérimentale mais uniquement à partir des secteurs ventraux. Cette remarque est importante car malgré le petit nombre de cas étudiés, il apparaît bien que les c.g.p. se distribuent préférentiellement dans la bordure ventrale du mésoderme latéral présomptif. Les gonocytes rencontrés, se localisent près d'une lame latérale (Pl. VIII, fig. E et F).

Le tableau 26 nous montre que dans 3 cas sur 4, les c.g.p. ne sont associées à aucune formation de type digestif. Dans le 4ème cas (opération 1 du tableau 26) cette possibilité ne peut être écartée et un doute persiste.

Les résultats obtenus font apparaître que :

- dans la première série (tableau 25), l'absence totale de c.g.p. s'accompagne d'une richesse en éléments musculaires (9 cas sur 9). Les lames latérales font pratiquement défaut (1 cas sur 9).

- dans la seconde série (tableau 26), où des c.g.p. sont observées, les formations musculaires sont moins fréquentes (3 cas sur 8). Les lames latérales sont plus nombreuses (6 cas sur 8).

La comparaison de ces 2 séries opératoires semble révéler que les fragments transplantés ne sont pas semblables. Dans la lère série, la majeure partie du secteur isolé correspond vraisemblablement au territoire présomptif des somites. Il se trouve ainsi dépourvu de tout élément germinal.

Ces résultats soulignent les difficultés rencontrées, au stade jeune gastrula, pour délimiter avec précision ce secteur privilégié et ce d'autant plus que des variations parfois considérables peuvent affecter la pigmentation des germes, à l'intérieur d'une même ponte.

Nous retiendrons de cette étude préliminaire que des c.g.p., prélevées au sein du mésoderme latéral présomptif, au stade gastrula, sont capables d'autodifférenciation. Le lieu d'implantation exclut toute influence stimulatrice émanant de la masse endoblastique. Nous infirmons ainsi les conclusions émises par NIEUWKOOP, et cela d'autant plus que les gonocytes primordiaux sont greffés sur un individu de stade nettement plus âgé chez qui la migration des c.g.p. est achevée.

Ces résultats confirment par là même ceux obtenus et relatés après les cultures in vitro et les implantations dans le blastocèle, les c.g.p. sont déterminées dès l'apparition de la lèvre dorsale du blastopore au stade 8 a. L'éventualité d'une action inductrice de la part de l'endoblaste dorso-caudal semble peu probable.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Les résultats que nous avons exposés démontrent clairement, chez le Pleurodèle, l'origine précoce des cellules germinales dans le feuillet mésodermique et leur migration en direction dorsale au sein de ce même feuillet vers les crêtes génitales. Nous discuterons les conditions dans lesquelles nous sommes parvenus à ces 2 conclusions majeures de notre travail.

- LOCALISATION AU STADE GASTRULA

Les seules données expérimentales que nous possédions sur la localisation précoce des c.g.p. au sein du feuillet mésodermique des Urodèles nous étaient apportées par NIEUWKOOP (1946) chez Triturus alpestris et T. cristatus et SMITH (1964) chez Ambystoma mexicanum, à la suite d'opérations réalisées au cours de la gastrulation au stade de la fente blastoporale en anse de panier. Chez le Pleurodèle, en l'absence de tout marqueur génétique approprié, il était inutile d'effectuer des transplantations orthotopes de mésoderme latéral présumé sur les jeunes gastrulas. Nous avons songé à le remplacer par de l'ectoderme banal prélevé sur un autre germe mais les quelques tentatives réalisées se sont vite révélées infructueuses, le germe présentant rapidement des signes d'exogastrulation. D'autre part, en admettant que le développement embryonnaire se poursuive normalement, il aurait fallu apprécier un déficit. Les différentes ablations entreprises au cours de la neurulation et du bourgeon caudal nous ont montré que l'interprétation des résultats présentait quelques incertitudes et cela malgré l'utilisation du calcul statistique. Les numérations effectuées sur des individus témoins ont mis en évidence une très grande fluctuation du nombre de c.g.p. entre individus de même stade. Des constatations analogues ont d'ailleurs été faites par HUMPHREY (1925) chez des espèces voisines : Triturus viridescens (20 à 60), Ambystoma maculatum (50 à 100) et Hemidactylum (120 à 200). De même, chez les Oiseaux FARGEIX et THEILLEUX (1966) ont constaté qu'un embryon pouvait renfermer 2 fois plus de c.g.p. qu'un autre également développé. Une autre possibilité s'offrait à l'expérimentateur ; greffer un territoire préalablement marqué (à la thymidine tritiée par exemple), opération pouvant s'effectuer au stade blastula. Mais les interventions réalisées par CAPURON (1967) s'étaient révélées inefficaces ; les c.g.p. ne présentant aucune trace de marquage, en raison vraisemblablement de l'absence de mitoses entre le moment de l'injection du produit marqué et le prélèvement du greffon.

Les techniques d'ablations et de transplantations se révélant peu compatibles avec la survie prolongée du germe opéré, nous nous sommes orientés vers la culture in vitro de fragments embryonnaires. Cette technique avait

permis à HOLTFFRETER dès 1929 d'étudier après 5 ou 6 jours de culture les capacités d'autodifférenciation des ébauches présomptives de la gastrula d'Amphi-
biens. Le milieu utilisé par cet auteur, une solution de sels minéraux, permet
la différenciation des explants grâce aux réserves vitellines contenues dans
les tissus cultivés. Les résultats obtenus après adjonction de sérum de cheval,
remarquables pour l'étude de la neurulation et des stades du bourgeon caudal,
se sont révélés inefficaces aux stades plus précoces. Le petit nombre de cas
positifs enregistrés, avec présence de c.g.p., restait insuffisant pour préciser
la répartition des gonocytes primordiaux au sein du mésoderme latéral présomptif.
Corrélativement la taille importante des fragments cultivés limitait la portée
de nos conclusions. Le fractionnement de la zone mésodermique présomptive en
3 ou 4 secteurs s'est heurtée à une difficulté supplémentaire : la dissociation
des explants après quelques jours. La technique de culture en sandwich atténue
la dissociation mais n'améliore pas, sauf exception, le degré de différen-
tiation des c.g.p. Il n'en demeure pas moins que des c.g.p. ont été mises en
évidence par culture in vitro mais dans des conditions trop aléatoires pour en
tirer des conclusions utiles.

Toutes les difficultés rencontrées au cours de cette étude mettent
en relief le rôle fondamental joué par le milieu où est placé l'explant. On
peut se demander si le milieu physiologique adopté (solution saline enrichie
de sérum de cheval) est adapté à une différenciation convenable des c.g.p.
Nous avons donc recherché une autre technique capable d'améliorer nos résultats.
Nous avons utilisé la technique d'implantation dans le blastocèle, encore
appelée "Einstechmethode". Cette technique d'explantation in vivo vise à placer
l'explant dans les conditions les plus favorables à sa différenciation ; le
fragment embryonnaire, introduit dans la cavité blastocoelienne, retrouve de
ce fait un milieu plus proche des conditions naturelles. Les résultats obtenus
par cette méthode démontrent clairement l'origine mésodermique des cellules
germinales primordiales chez le Pleurodèle. Les c.g.p. sont déterminées dès
l'apparition de l'encoche de la lèvre dorsale du blastopore (st. 8 a). C'est
à ce jour le stade le plus précoce où des c.g.p. ont été mises en évidence.
Ces c.g.p. sont dispersées dans toute la couronne de mésoderme latéral pré-
somptif. SMITH (1964) a fait la même constatation chez l'Axolotl. Certains
de nos résultats suggèrent même une répartition plus localisée, à la limite des
feuilletts ectodermique et mésodermique.

Ce territoire transplanté en position ventrale, sur le flanc d'un
bourgeon caudal (st. 24 et 26) différencie effectivement des c.g.p. (CAPURON,
non publié). Autre preuve de cette détermination précoce, la même opération

mais réalisée en position dorsale, à la surface du tube nerveux, confirme les résultats précédents. L'origine mésodermique de ces cellules, mise en évidence par NIEUWKOOP (1946) chez 2 espèces de Triturus et SMITH (1964) chez l'Axolotl est ainsi étendue au Pleurodèle. Il est logique de penser que cette origine est commune aux Urodèles:

- DETERMINATION DES ELEMENTS GERMINAUX

A la suite de ses nombreux travaux, NIEUWKOOP (1946) soulignait la nécessité d'une influence stimulatrice de l'endoderme dorso-caudal, au cours de la gastrulation, pour assurer une différenciation normale des gonocytes primordiaux. Dans cette perspective nous avons effectué au stade jeune gastrula diverses séries expérimentales dans lesquelles de l'endoblaste présomptif était associé au secteur mésodermique initialement isolé et mis en culture. Cet apport endoblastique n'a pas favorisé la différenciation des éléments germinaux. L'activité stimulatrice de l'endoderme, jugée indispensable par NIEUWKOOP, n'a pu être confirmée par nos travaux ultérieurs relatifs aux conditions de détermination des c.g.p. pendant la gastrulation.

Nos résultats, relatés dans le chapitre III, bien que partiels montrent en effet que des c.g.p. sont capables de se différencier en dépit de l'absence de tout contact avec l'endoderme. Les c.g.p. sont déterminées quand apparaissent les premiers signes de la gastrulation. Au stade neurula nous confirmons cette détermination précoce. Nos conclusions rejoignent celles émises par KOTANI (1958) et AMANUMA (1958) ; dans leurs expériences, l'extirpation de l'endoderme caudal au stade jeune neurula n'affecte pas la différenciation des c.g.p.

- EVOLUTION DES TERRITOIRES ISOLES

Les techniques d'explantation in vitro et in vivo utilisées au cours de l'étude de la gastrulation nous ont permis de suivre l'évolution de certains territoires présomptifs et de comparer leurs prestations à celles prévues par les cartes établies par VOGT (1925, 1929) et PASTEELS (1942). Dans la plupart des cas, les fragments embryonnaires isolés évoluent conformément à la nature du territoire dont elles dérivent. Nous confirmons par là même les nombreux travaux de HOLTGRETER (1938 a, b). La zone marginale ventrale et latéro-ventrale du mésoderme présomptif de la jeune gastrula fournit normalement du pronéphros, des érythrocytes et des parois coelomiques. Cependant des tubules pronéphrétiques et des hématies peuvent apparaître dans tous les explants prélevés dans

la région latéro-ventrale. Les secteurs de cette zone, isolés et cultivés, peuvent donner des tissus aussi variés que des somites, structures neurales et épidermiques dont la différenciation histologique ne correspond pas exactement à leur valeur présomptive. Les explants expriment des potentialités plus importantes que s'ils avaient été laissés en place dans le germe normal.

Il faut remarquer dans nos expériences que le territoire présomptif de l'angioblastème ne se différencie pleinement qu'après implantation dans le blastocèle. Les capacités d'autodifférenciation de ce territoire, remarquées par HOLTFRETER (1938 a, b) et YAMADA (1940) ne se sont pas vérifiées dans nos conditions expérimentales. De même l'endoderme apporté dans certaines cultures en sandwich et que HOLTFRETER (1938 a, b) considère comme déterminé dès le stade de la jeune gastrula ne s'est jamais différencié en structures digestives typiques. D'autres auteurs, tels que BALINSKY (1938, 1947 et 1948), NAKAMURA et TAHARA (1953 et 1954), OKADA (1953 à 1960) et TAKATA (1960) ont également abordé l'étude de la détermination précoce de l'endoderme. La comparaison des nombreux résultats publiés par ces auteurs révèle quelques divergences au sujet du moment où s'effectue la détermination effective des différentes parties de l'endoderme. La participation du mésoderme dans la détermination de cet endoderme est discutée. Une relative incertitude persiste toujours sur la nature des tissus isolés et ceci concerne plus particulièrement l'étude entreprise sur la très jeune gastrula. L'observation sous la loupe binoculaire du pôle végétatif d'un germe de stade 8 a rendu compte des difficultés qui se posent à l'expérimentateur, il n'apparaît pas de limite rigoureuse entre la zone mésodermique latérale présomptive et les tissus voisins (ectoblaste et masse endoblastique). Il n'y a pas de ségrégation brutale entre ces feuillets et la qualité présomptive d'un territoire peut toujours être mise en doute.

Autre exemple significatif, la présence d'éléments neuroïdes a été souvent remarquée dans les prestations obtenues après culture in vitro de fragments embryonnaires de gastrula. On peut penser que des conditions défavorables de culture, imputables au milieu, puissent provoquer une autoneuralisation des explants. En effet BARTH (1941) affirmait que l'ectoderme présomptif d'Ambystoma punctatum était capable de différencier des formations nerveuses dans la solution de HOLTFRETER. Pour HOLTFRETER (1944) ce seraient les substances libérées par la cytolysé qui induiraient la neurulation de l'ectoderme. Plus récemment BARTH (1965) a montré que de l'épiderme présomptif de la gastrula de Rana pipiens cultivé dans une solution saline était capable de se différencier en cellules nerveuses et pigmentaires. L'induction nerveuse serait provoquée par les ions présents dans le milieu. Ces différentes observations justifient entièrement les précautions prises pour interpréter nos résultats

- MIGRATION VERS LES FUTURES CRETES GENITALES

Les c.g.p. décelées au sein du mésoderme latéral présomptif de la jeune gastrula vont se déplacer pour coloniser les futures crêtes génitales. Cette migration ne débute qu'à la fin de la neurulation, au cours du stade 21. Toutes les opérations réalisées antérieurement, depuis la formation de la plaque neurale jusqu'à la soudure complète des bourrelets neuraux, signalent leur présence au voisinage du blastopore en position ventrale et latérale par rapport à ce dernier. Cet emplacement correspond au territoire dans lequel les c.g.p. ont été mises en évidence et qui, après invagination en cours de gastrulation, se retrouve situé en position ventro-latérale au stade jeune neurula (st. 15).

L'ablation d'ecto-mésoderme de type A se traduit par un déficit plus ou moins important du côté opéré. La stérilité totale du germe ne peut être obtenue qu'à l'issue d'une ablation complète de toute la région blastoporale. Une telle situation a été mise en évidence chez Ambystoma mexicanum par NIEUWKOOP (1946) et SMITH (1964).

Aucun changement ne survient au cours de la neurulation. Au stade 21 une partie des c.g.p. quitte leur position initiale. Il n'est pas exclu de penser que cette amorce de migration est facilitée, sinon déclenchée, par l'abouchement de l'uretère primaire au cloaque. Le développement du canal de Wolff s'achève en effet à la fin de la neurulation (HOUILLOIN, 1956). Cette migration en direction dorsale s'amplifie au stade 22 (ablations de type D, F et G). L'explantation in vitro de fragments embryonnaires aux stades 21 et 22 est significative ; les résultats obtenus révèlent parfaitement la progression des c.g.p. le long du trajet de l'uretère primaire. Une marque colorée posée au niveau du mésoderme latéral présomptif d'une gastrula ou d'une jeune neurula suit exactement le même parcours. Cette phase du déplacement peut être considérée comme uniquement passive et s'inscrirait ainsi dans l'ensemble des mouvements de convergence du mésoderme.

Aux stades 23 et 24, une grande partie des gonocytes a atteint le mésoderme intermédiaire. Les interventions réalisées en position ventro-latérale sont demeurées sans effet. C'est à cette période que furent réalisées les premières investigations cytologiques qui permirent à HUMPHREY (1925) de repérer les c.g.p. chez des larves d'Ambystoma mexicanum (st. 25 de la table de HARRISSON). NIEUWKOOP (1964) et STARK (1955) formulent les mêmes constatations sur des espèces voisines.

Dès les stades 25 et 26, les cellules qui jusqu'à présent étaient restées superficielles se déplacent vers l'axe de l'embryon en compagnie de l'uretère primaire. Leur élimination reste possible à condition de gratter le

mésoderme intermédiaire en profondeur. HUMPHREY (1927, 1928) a pratiqué cette opération sur des larves d'Ambystoma mexicanum (st. 32 à 36 de la table de HARRISSON), l'intervention entraînait la stérilité presque complète des embryons opérés. Par contre la transplantation orthotopique de ce mésoderme et des c.g.p. qu'il contient est plus difficilement réalisable, ceci expliquerait que des femelles adultes, ayant reçu au stade 26 des cellules germinales primordiales marquées génétiquement, présentent en général un mélange d'ovocytes de type receveur et de type donneur (IACROIX et CAPURON, 1966).

En résumé, chez le Pleurodèle, à des stades caractéristiques, l'ablation localisée de l'ectomésoderme entraîne l'absence de gonocytes chez l'embryon opéré. En conséquence, les c.g.p. ne peuvent dériver secondairement de cellules somatiques présomptives et sont ainsi dépourvues de toute capacité de régulation. Ces conclusions ne font pas l'unanimité et certains auteurs estiment que les c.g.p. ont une différenciation épigénétique à partir des tissus somatiques.

ASAYAMA (1939, 1950, 1961) juge que l'ablation unilatérale du mésoderme intermédiaire, pratiquée chez Triturus pyrrhogaster au stade 31 (table d'OKADA et ICHIHAWA¹⁹⁴⁷) n'entraîne pas la stérilité de la larve du côté opéré. Complétant son expérimentation par des transplantations orthotopes et hétérotopes de mésoderme intermédiaire, il en conclut que les cellules germinales pourraient se former à partir du mésoderme latéral à un stade aussi avancé que le bourgeon caudal. Pour AMANUMA (1957) l'ablation du mésoderme intermédiaire présomptif de la gastrula (pratiquée unilatéralement) et de la neurula (réalisée bilatéralement) de Triturus pyrrhogaster et Hynobius nebulosus n'affecte pas le nombre de gonocytes. KOTANI (1957) prétend même que de l'ectoderme prélevé sur la gastrula de Triturus pyrrhogaster et transplanté à l'emplacement ^{du mésoderme} intermédiaire présomptif d'une autre gastrula est capable de se différencier en cellules germinales.

ASAYAMA et AMANUMA (1957) analysant l'origine possible des c.g.p. rencontrées dans les crêtes génitales d'embryons secondaires induits par la greffe de lèvres dorsales penchent pour une induction de novo des c.g.p. à partir des cellules somatiques de l'embryon hôte. Les mêmes opérations réalisées chez le Pleurodèle par CAPURON (1968) tendent à infirmer ces conclusions. Selon cet auteur les numérations gonocytaires effectuées prouvent que les c.g.p. de l'embryon secondaire proviennent en fait du lot initial de c.g.p. de l'embryon hôte, ces cellules se partageant entre les crêtes génitales normales et surnuméraires. Les résultats obtenus par ces différents auteurs japonais ne sont pas exempts de critiques : leurs interprétations supposent en effet une élimination complète des c.g.p. des individus opérés, opération qui ne peut être garantie par les méthodes utilisées. L'absence de marquage limite gravement la portée

de leurs applications. Au contraire les données expérimentales rapportées par SMITH (1964), IACROIX et CAPURON (1966) et nous-mêmes montrent que les c.g.p. des Urodèles ne peuvent dériver secondairement des cellules somatiques et sont ainsi dépourvues de toute capacité de régulation. Corrélativement on peut assurer que ces cellules sont à l'origine des futurs gamètes.

La technique de culture in vitro, utilisée parallèlement aux techniques d'ablations, confirme nos précédents résultats. Elle nous a permis de localiser de manière concrète les cellules germinales au cours de leur progression vers les futures crêtes génitales. Les différents secteurs isolés aux stades du bourgeon caudal ont évolué conformément à leur lieu d'origine. Cependant l'endoderme s'est révélé incapable de se différencier en épithélium intestinal. Cette observation surprend car OKADA (1953 à 1960) et CHIBON (1969), par des techniques variées, ont montré qu'aux stades du bourgeon caudal la détermination de l'endoderme était réalisée.



Si nous avons pu apporter quelques données expérimentales en faveur de l'origine mésodermique précoce des gonocytes et sur leur migration vers les futures crêtes génitales, il n'en demeure pas moins qu'un grand nombre de faits restent à préciser. 2 points principaux devront être abordés successivement :

- dans un premier temps, il faudra mettre en évidence la présence d'un déterminant germinal analogue au plasme germinal observé chez les Anoures et montrer que celui-ci se distribue effectivement dans les c.g.p. Ce qui nous permettra d'étendre au Pleurodèle la notion de continuité de la lignée germinale. Cette ségrégation précoce conduirait les gonocytes primordiaux à un état de pré-détermination, leur détermination n'intervenant, sous l'influence stimulatrice de l'endoderme dorso-caudal, que pendant la gastrulation.

- dans un deuxième temps, il sera nécessaire de poursuivre l'étude des conditions de détermination et de différenciation des c.g.p. pendant les phases initiales du développement embryonnaire afin de préciser l'importance de la stimulation endoblastique.

BIBLIOGRAPHIE

- AMANUMA, A., 1957 - Effect of extirpation of the presumptive intermediate mesoderm upon the differentiation of the primordial germ cells. Zool. Mag. 66, 32-35 (En Japonais, résumé Anglais).
- AMANUMA, A., 1958 - On the rôle of the dorso-caudal endoderm in the formation of the primordial germ cells. J. Inst. Polytech., Osaka City Univ., Ser. D, 9, 211-216.
- ASAYAMA, S., 1939 - Extirpation of the intermediate mesoderm in embryos of Triturus pyrrhogaster (Boie). Bot. and Zool. 7, 1189.
- ASAYAMA, S., 1950 - The Developmental potencies of the intermediate mesoderm of Triturus pyrrhogaster when transplanted into orthotopic or heterotopic site in the body wall of another embryo. J. Inst. Polytech., Osaka City Univ., Ser. D, 1, 13-32.
- ASAYAMA, S., 1961 - Potency of lateral plate mesoderm relating to the formation of reproductive tissue. Zool. Mag. 70, 7-11. (En Japonais, résumé Anglais).
- ASAYAMA, S. et AMANUMA, A., 1957 - On the primordial germ cells of the secondary embryo induced by the organizer. Zool. Mag. 66, 279-283. (En Japonais, résumé Anglais).
- BALINSKY, B.I., 1938 - On the determination of the endodermal organs in Amphibia. C.R. Acad. Sci., URSS, 20, 215-217.
- BALINSKY, B.I., 1947 - Kinematik des entodermalen Materials bei der Gestaltung der wichtigsten Teile des Darmkanals bei den Amphibien. Arch. Entwickl. Mech. Org., 143, 126-166.
- BALINSKY, B.I., 1948 - Korrelationen in der Entwicklung der Mund- und Kiemenregion und des Darmkanals bei Amphibien. Arch. Entwickl. Mech. Org., 143, 365-395.

- NAKAMJRA, O. et TAHARA, Y., 1953 - Formation of the stomach in Anura.
Mem. Osaka Univ. Lib. Arts and Ed., 2, 1-8.
- NAKAMJRA, O. et TAHARA, Y., 1954 - Formation of the intestine in Anura.
Mem. Osaka Univ. Lib. Arts and Ed., 3, 77-89.
- NIEUWKOOP, P.D., 1946 - Experimental investigations on the origin and the determination of the germ cells, and on the development of the lateral plates and germ ridges in Urodeles.
Arch. neerl. Zool., 8, 1-205.
- NIEUWKOOP, P.D., 1964 - Le problème de la lignée germinale chez les Urodèles, 195-204, tiré de : L'origine de la lignée germinale.
Hermann (Paris).
- NIEUWKOOP, P.D. et FABER, J., 1956 - Normal table of Xenopus laevis (Daudin).
North Holland Publ. Co. (Amsterdam).
- OKADA, T.S., 1953 a - Role of the mesoderm in the differentiation of endodermal organs.
Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto, ser. B, 20, 157-162.
- OKADA, T.S., 1953 b - Regulative power of the endoderm in Urodele.
Zool. Mag., 62, 288-291. (En Japonais, résumé Anglais).
- OKADA, T.S., 1954 a - Experimental studies on the differentiation of the endodermal organs in Amphibia. I. Significance of the mesenchymatous tissue to the differentiation of the presumptive endoderm.
Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto, ser. B, 21, 1-6.
- OKADA, T.S., 1954 b - Experimental studies on the differentiation of the endodermal organs in Amphibia. II. Differentiating potencies of the presumptive endoderm in the presence of the mesodermal tissues.
Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto, ser. B, 21, 7-14.
- OKADA, T.S., 1955 a - Experimental studies on the differentiation of the endodermal organs in Amphibia. III. The relation between the differentiation of pharynx and head-mesenchyme.
Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto, ser. B, 22, 17-22.

- OKADA, T.S., 1955 b - Experimental studies on the differentiation of the endodermal organs in Amphibia. IV. The differentiation of the intestine from the fore-gut.
Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto, ser. B, 22, 210-214.
- OKADA, T.S., 1957 - The pluripotency of the pharyngeal primordium in Urodelan neurulae.
J. Embry. exp. Morph., 5, 438-448.
- OKADA, T.S., 1960 - Epithelio-mesenchymal relationships in the regional differentiation of the digestive tract in the Amphibian embryo.
Wilhelm Roux'Arch. EntwMech. Org., 152, 1-21.
- OKADA, Y.K. et ICHIKAWA, M., 1947 - Tables of developmental stages of Triturus pyrrhogaster.
Annual Rep. Exp. Morphol. (Tokyo), 3, 1-6.
- PADOA, E., 1963 - Le gonadi di girini di Rana esculenta de vova irradiate con ultravioletto.
Monit. Zool. Ital., 70/71, 238-249.
- PASTEELS, J., 1942 - New observations concerning the maps of presumptive areas of the young Amphibian Gastrula (Amblystoma and Discoglossus).
J. exp. Zool., 89, 255-282.
- RUGH, R., 1948 - Experimental embryology. A manual of techniques and procedures
Edit. rev., Burgess publishing Company, Minneapolis, Minnesota.
- SMITH, L.D., 1964 - A test of the capacity of presumptive somatic cells to transform into primordial germ cells in the mexican Axolotl.
J. exp. Zool., 156, 229-242.
- SMITH, L.D., 1966 - The role of a "germinal plasm" in the formation of primordial germ cells in Rana pipiens.
Develop. Biol., 14, 330-347.
- STARK, O.J., 1955 - Entwicklung der Gonaden und Geschlechtszellen bei Triton alpestris, cristatus und taeniatus, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Verschiedenheiten.
Z. Zellforsch., 41, 285-334.

PLANCHE I

Etude histologique des prestations fournies par la mise en culture des secteurs ecto-mésodermiques prélevés au stade neurula.

Fig. A et D - Aspect général des prestations obtenues.

Les secteurs isolés se sont différenciés en vésicules limitées par une mince enveloppe ectodermique (e), doublées intérieurement par du mésenchyme (m).

Les c.g.p. (flèche) sont groupées en un seul flot, faisant saillie dans la cavité coelomique (c).

Fig. B - Illustration du premier type de répartition des c.g.p.

Les gonocytes (flèche) se répartissent au sein même du mésenchyme (m). e, enveloppe ectodermique.

Fig. C, E et F - Illustration du second type de répartition des c.g.p.

L'flot gonocytaire (flèche) est enveloppé dans un fin épithélium (pointes) relié plus ou moins étroitement au tissu mésenchymateux (m) bordant l'enveloppe ectodermique (e). Les c.g.p. sont situées dans la cavité coelomique (c). On remarque que dans la fig. E le mésenchyme se trouve réduit à un simple épithélium.



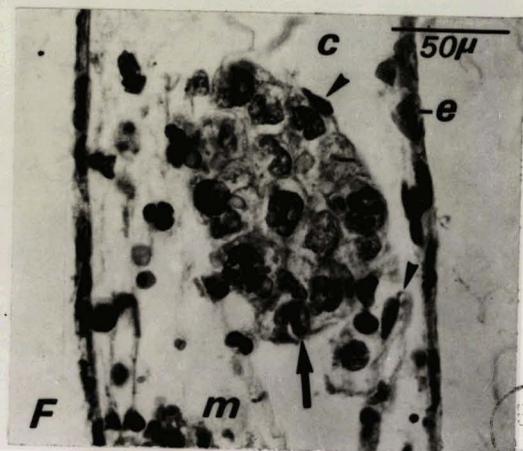
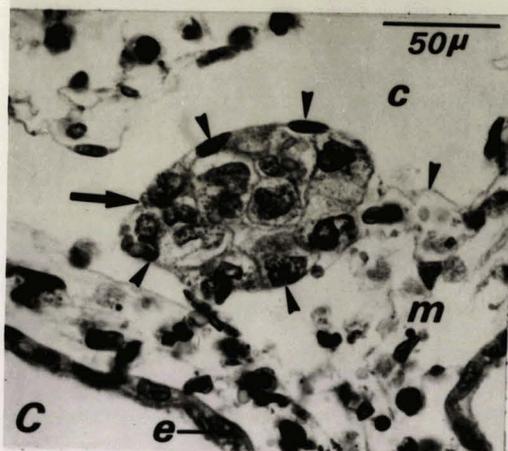
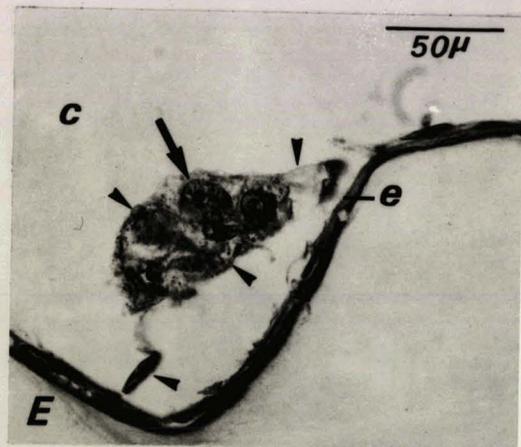
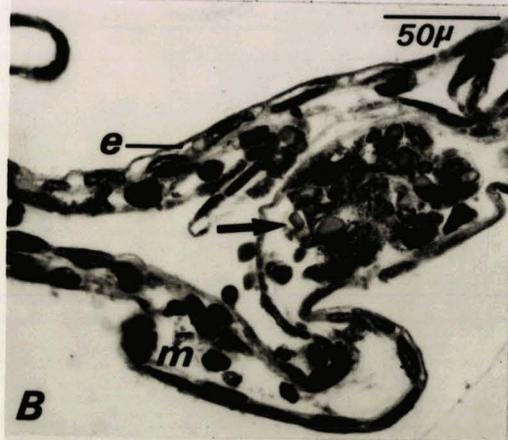


PLANCHE II

Prestations fournies par la mise en culture des divers secteurs prélevés aux différents stades du bourgeon caudal.

- Stades 21 et 22

Fig. A - Secteur 1 : formation d'une vésicule plurilobée.

Fig. B et C - Secteurs 2 : formation d'une vésicule bilobée ou quadrilobée.
Ce type de prestation est caractérisé par l'émission d'un appendice caudal (ac) très développé.

Fig. D - Secteur 3 : formation d'une vésicule bilobée avec une nageoire dorsale (nd).

- Stades 24 et 26

Fig. E - Secteur C : formation d'une queue.

Fig. F - Secteur V : formation d'une vésicule plurilobée à paroi transparente.

Fig. G - Secteur D 1 : formation d'une prestation analogue à celle décrite sur la fig. D.

Fig. H - Secteur D 2 : formation d'une vésicule quadrilobée avec une nageoire dorsale (nd) et une constriction ventrale (cv) délimitant 2 lobes ventraux bien formés.

Toutes les figures sont à la même échelle.



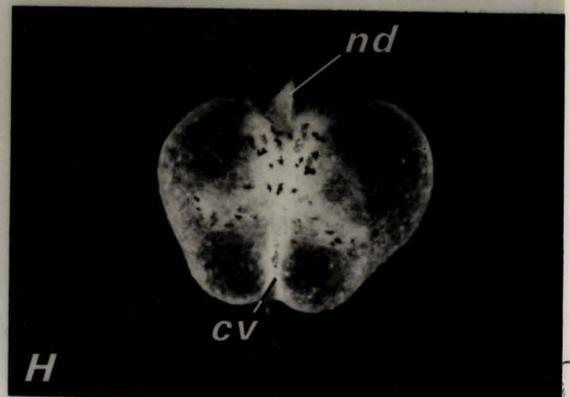
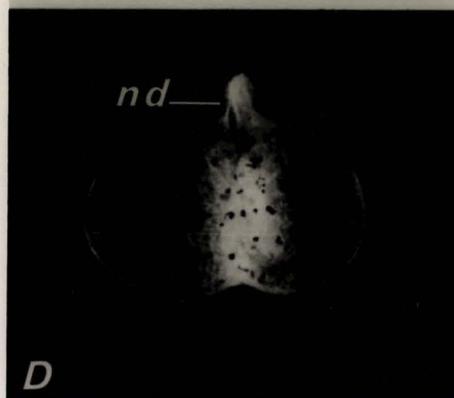
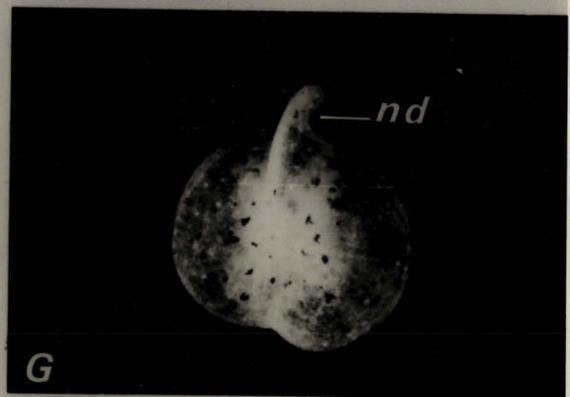
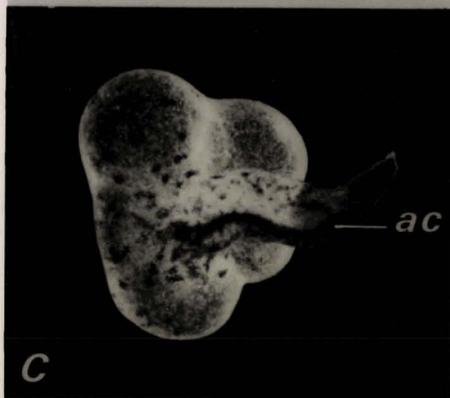
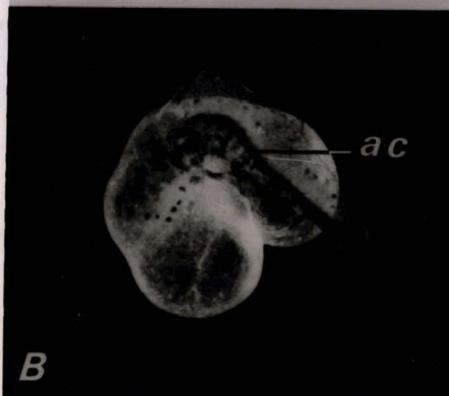
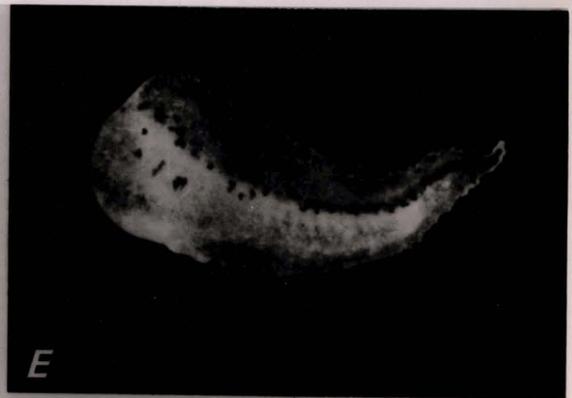
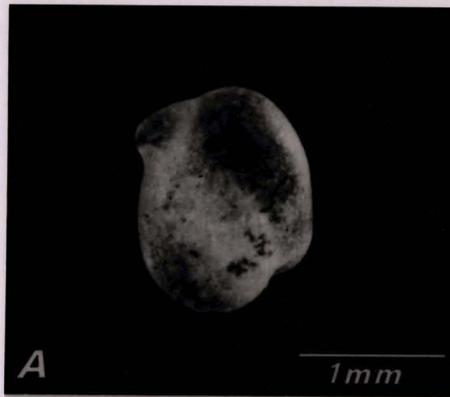


PLANCHE III

Etude histologique des prestations obtenues après mise en culture des différents secteurs prélevés au stade 24 du bourgeon caudal.

Fig. A, B et C - Coupes transversales du secteur D 1 représenté Planche II, fig. G. On reconnaît les structures dorsales habituelles : système nerveux (sn), corde (c) et myotomes (my). La région ventrale ne renferme que du tissu mésenchymateux (m). On remarque la présence de gonocytes (g) à l'angle inféro-interne des myotomes. Lorsque les uretères primaires (up) sont présents, les c.g.p. se répartissent à leur voisinage immédiat. On note l'absence de tube digestif.

Fig. D - Coupe dans la vésicule plurilobée représentée Planche II, fig. F. Les gonocytes (g) se localisent au sein des travées mésenchymateuses (m). On remarque la présence d'une vaste cavité au centre de la prestation.

Fig. E - Vue de détail de la fig. D. Les gonocytes (g) sont identifiables par leur dimension plus grande que les cellules somatiques voisines et par leur noyau à contour plurilobé renfermant 1 ou 2 nucléoles et par leur cytoplasme riche en plaquettes vitellines.
m, mésenchyme.



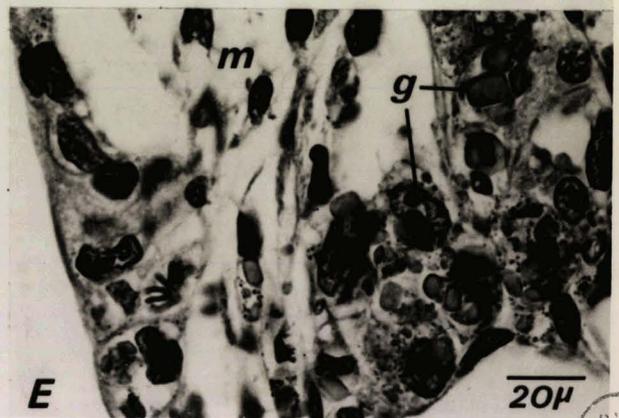
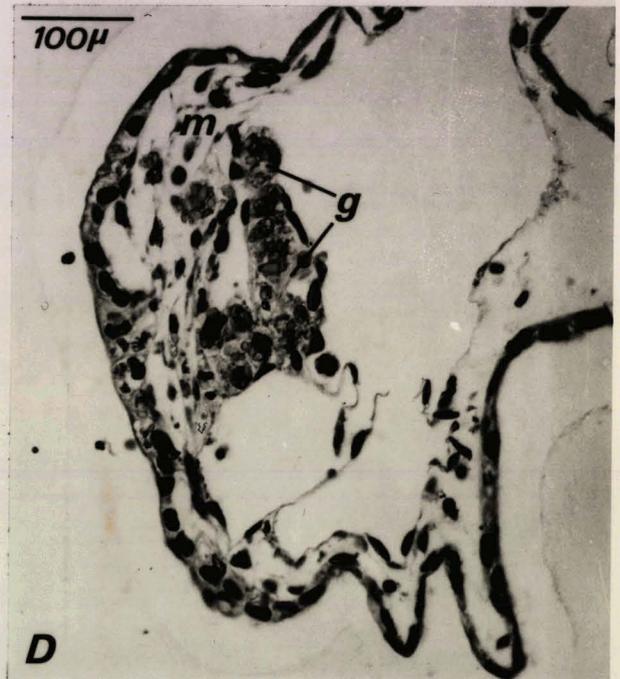
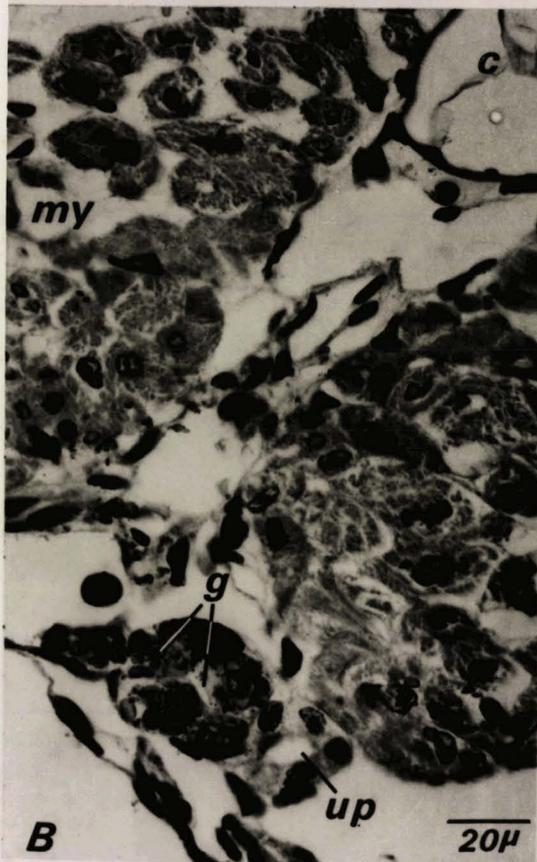


PLANCHE IV

Prestations fournies par la mise en culture de secteurs prélevés au stade gastrula.

Fig. A à F - Les diverses figures illustrent les principaux types de prestation rencontrés. Le secteur mésodermique isolé évolue, en général, en une vésicule ovoïde, plus ou moins allongée. La paroi, transparente, révèle la présence de travées mésenchymateuses (tm) sillonnant une vaste cavité, au centre de la prestation.

On observe parfois quelques particularités :

Fig. A - Une ébauche de membre (em) s'est différenciée à la surface de la prestation.

Fig. F - La vésicule est recouverte de mélanophores (m) et présente à l'une de ses extrémités une réaction de type caudal (rc).

Toutes les figures sont à la même échelle.



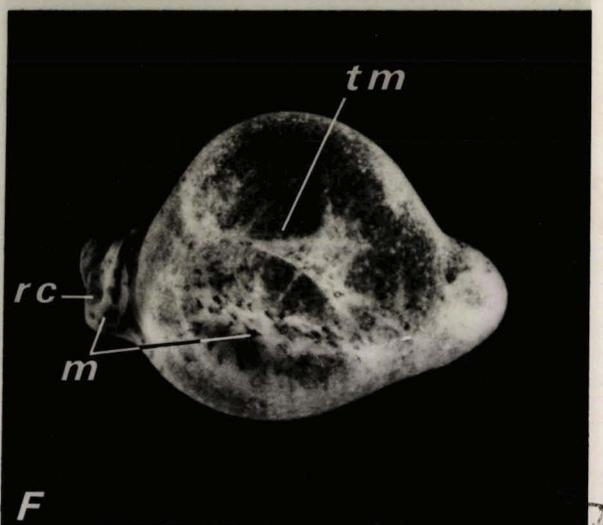
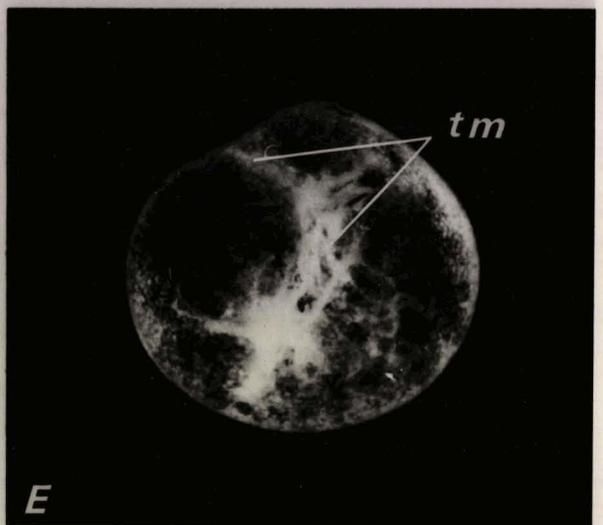
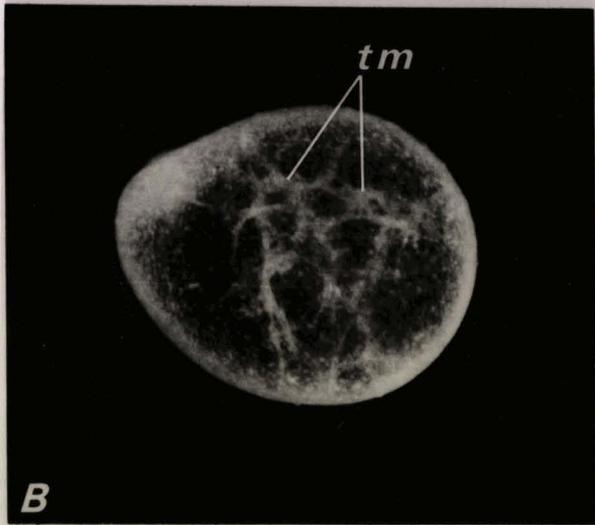
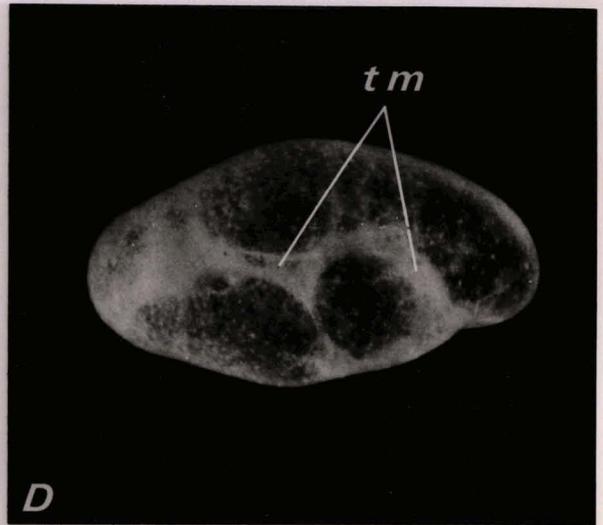
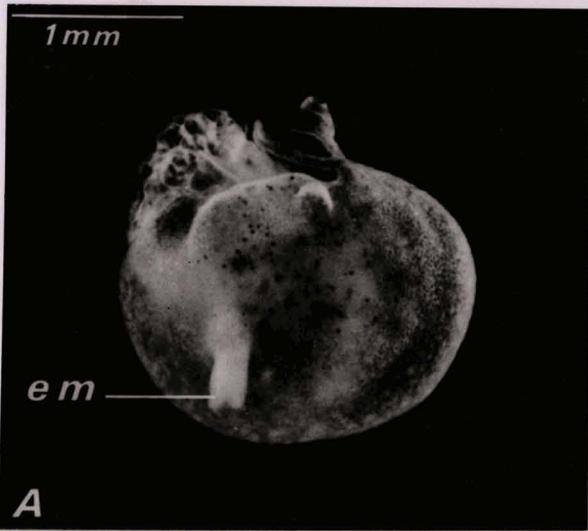


PLANCHE V

Etude histologique des prestations fournies par la mise en culture de secteurs prélevés au stade gastrula.

Les diverses figures correspondent aux coupes réalisées dans les vésicules représentées sur la Planche IV.

Les flèches (\rightarrow) indiquent l'emplacement des c.g.p.

Fig. A - Les gonocytes se répartissent dans le mésenchyme (mes) bordant l'enveloppe de la vésicule (e).

Fig. B - Les gonocytes sont groupés dans une travée mésenchymateuse (tm) reliée au mésenchyme (mes) tapissant intérieurement la paroi de la prestation (e).

Fig. C - Vue de détail de la figure A. Cette figure illustre parfaitement 2 caractéristiques communes aux c.g.p. : un cytoplasme finement granulaire et renfermant de volumineuses plaquettes vitellines (Pointes). On remarque la présence de mélanophores (mel) entre les c.g.p.

Fig. D et E - Les c.g.p. se localisent contre les tubules pronéphrétiques (tp).

Fig. F - Outre leur présence dans l'une des travées mésenchymateuses (tm), des c.g.p. sont également présentes dans la cavité de la vésicule.



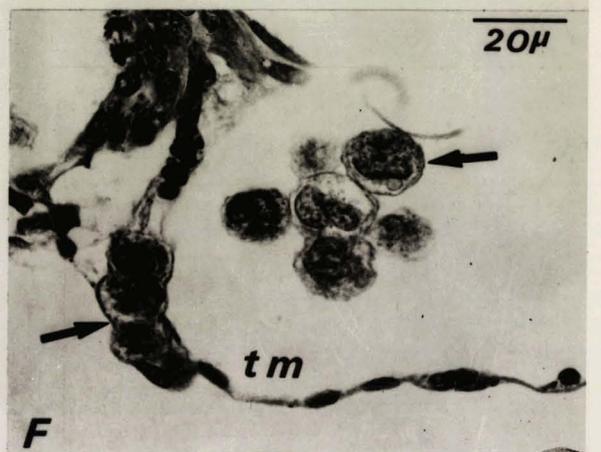
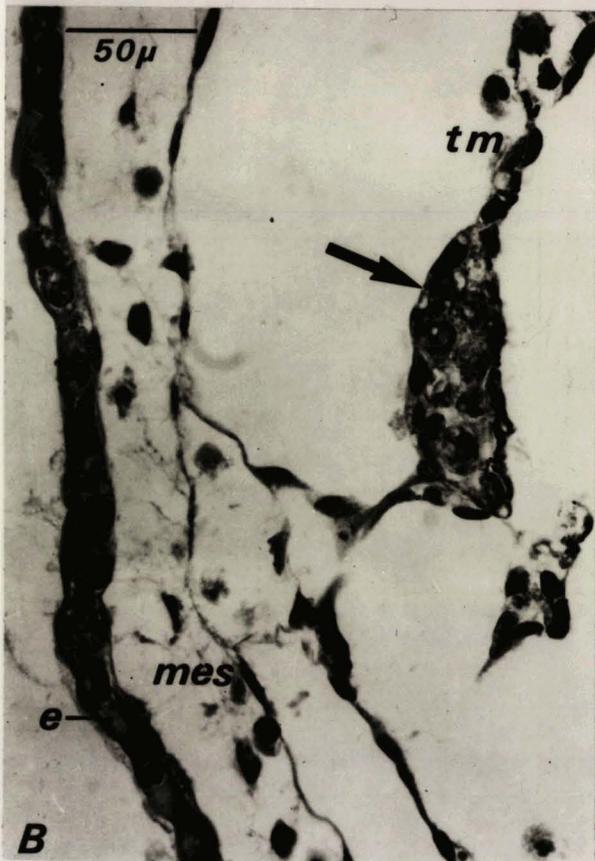
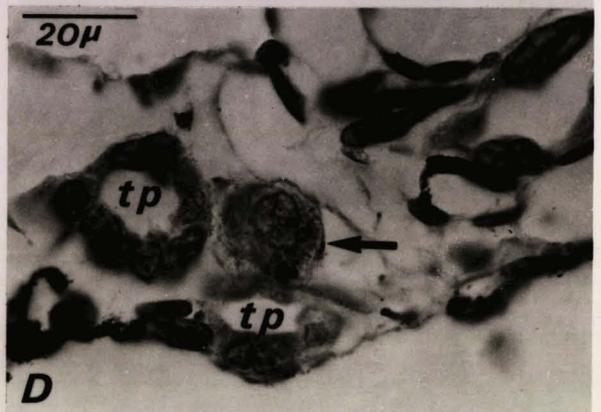


PLANCHE VI

Réactions obtenues à l'état larvaire après implantation dans le blastocèle de gastrula d'un fragment de mésoderme latéral présomptif.

Cette planche illustre les principaux types de réactions observés.

(→)

Les flèches indiquent l'emplacement des réactions.

Fig. A - Réaction spectaculaire au niveau céphalique.

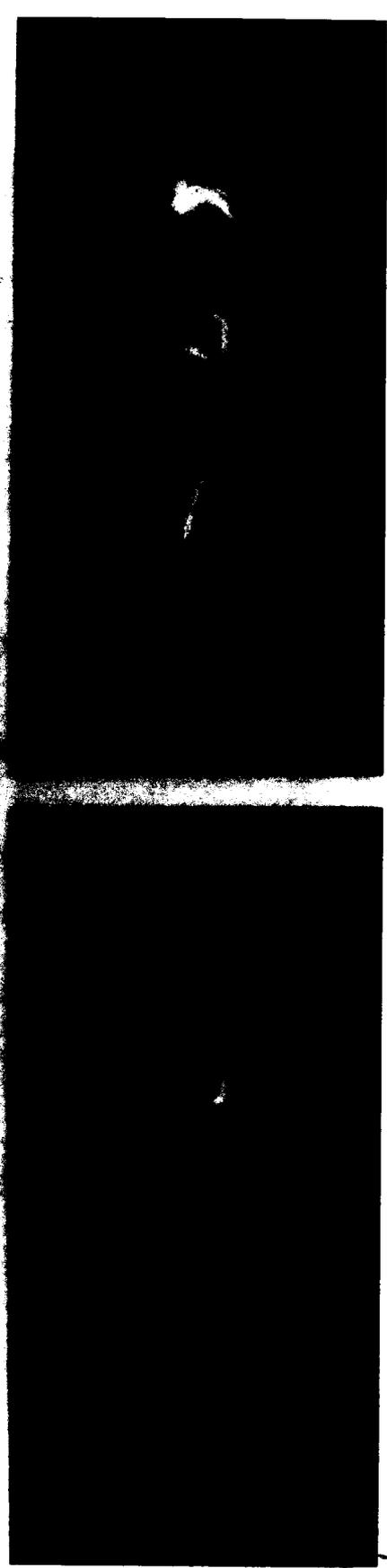
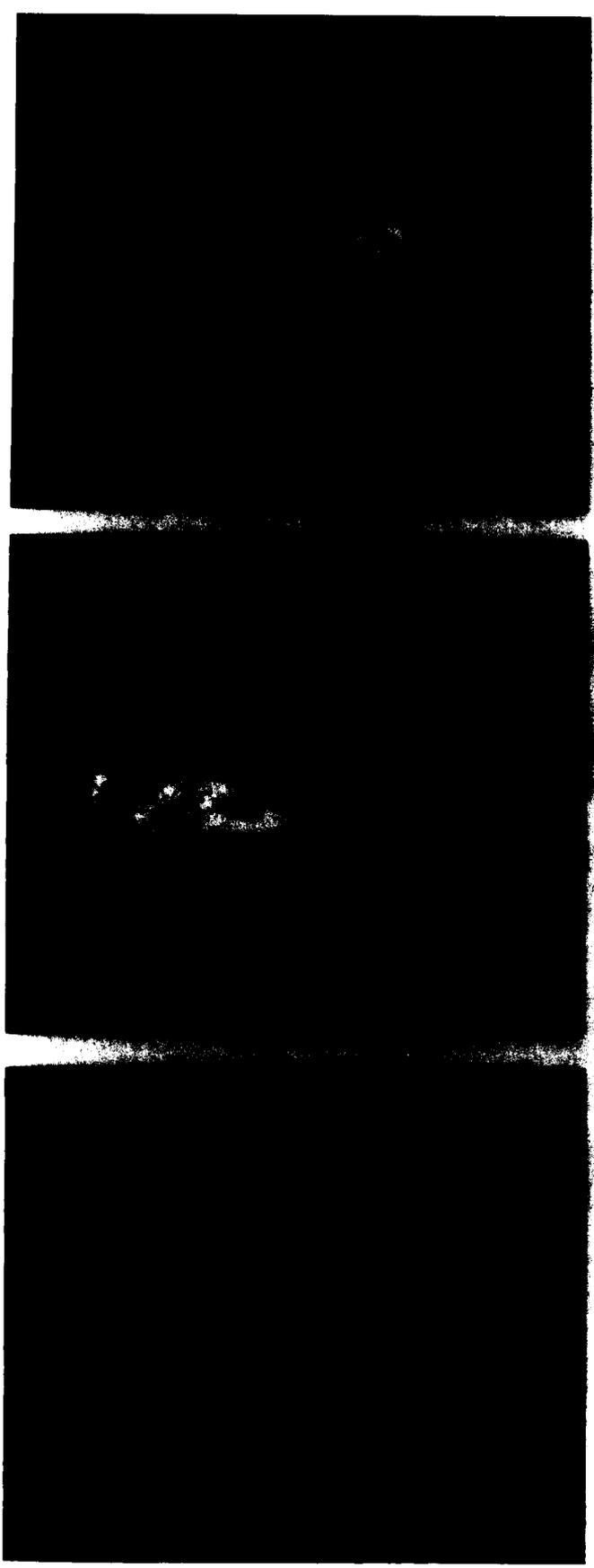
Fig. B - Réaction au niveau troncal.

Fig. C - Un appendice caudal (ac) s'est différencié à l'extrémité de la réaction.

Fig. D et E - Vues ventrales des larves opérées. Le tube digestif émet une digitation vers la réaction.

Toutes les figures sont à la même échelle.





BUS
JILLE

PLANCHE VII

Etude histologique des réactions obtenues à l'état larvaire après implantation dans le blastocèle de gastrula d'un fragment de mésoderme latéral présomptif.

Les flèches (→) indiquent l'emplacement des c.g.p.

Fig. A et B - Ilot gonocytaire important dans la paroi péritonéale ventrale du tube digestif (Td), faisant saillie dans la cavité coelomique (c).

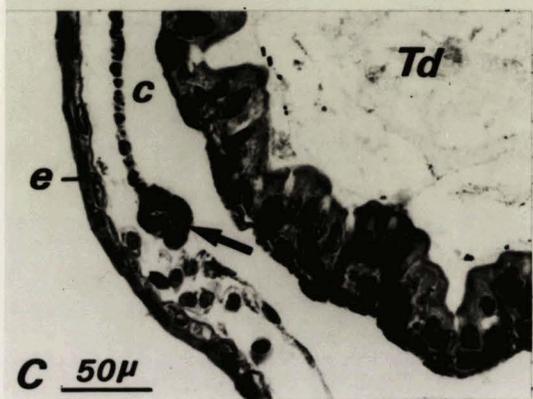
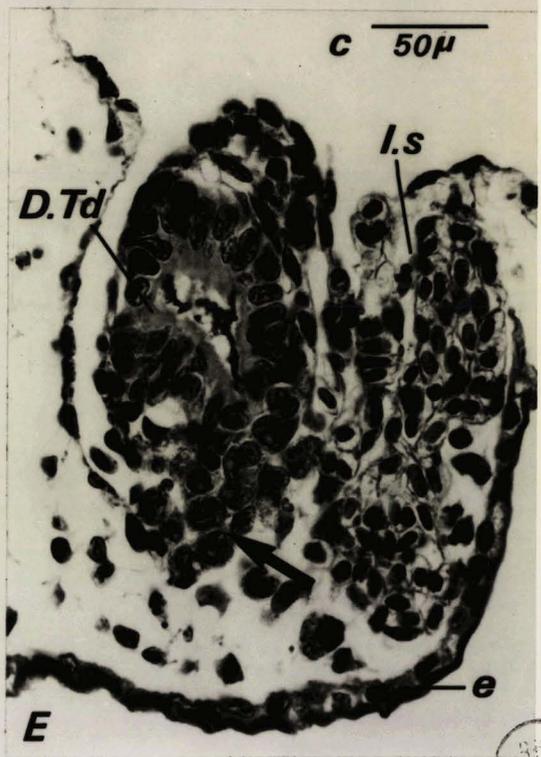
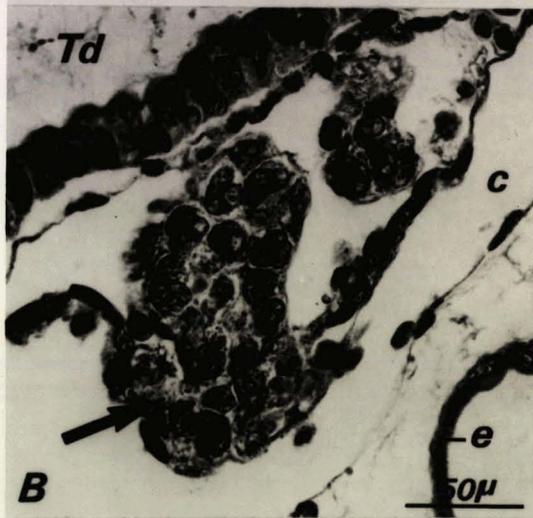
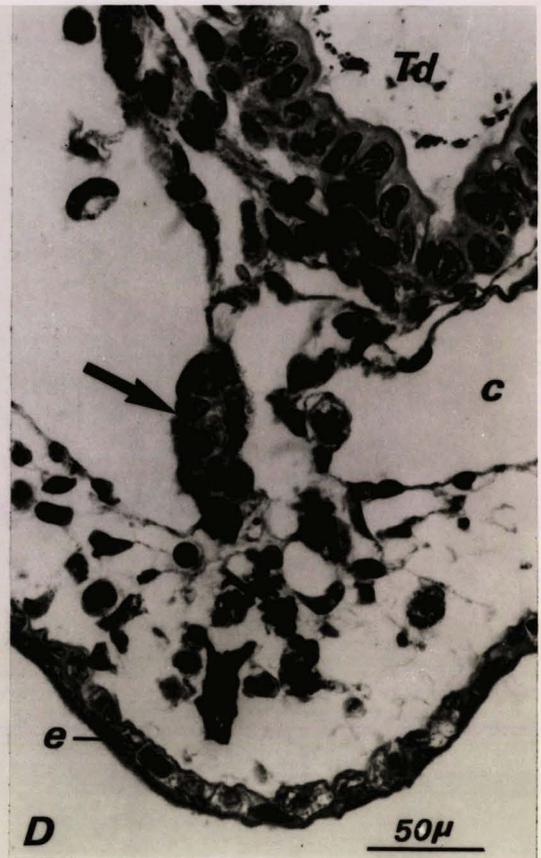
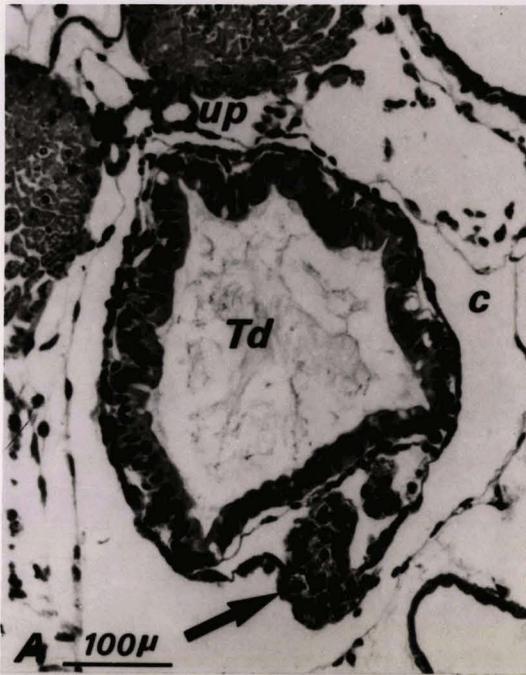
Fig. C - Gonocytes situés dans la somatopleure en l'absence de toute réaction visible extérieurement.

Fig. D - Présence d'un îlot gonocytaire au niveau d'un mésentère ventral résultant de la fusion des 2 lames latérales.

Fig. E - Ilot gonocytaire localisé au voisinage d'une digitation du tube digestif (D Td). Présence d'un volumineux îlot sanguin (Is).

e, épiderme ; Up, uretère primaire.





305
1951

PLANCHE VIII

Etude histologique des réactions obtenues à l'état larvaire après transplantation en position dorsale de différents secteurs prélevés aux stades de la gastrulation et de la neurulation.

Les figures illustrent les coupes transversales effectuées au niveau des réactions dorsales.

Les flèches (→) indiquent l'emplacement des c.g.p.

Réactions obtenues après transplantation d'ecto-mésoderme de jeune neurula.

Fig. A - L'îlot gonocytaire est observé sur le bord d'une lame latérale (l.l). On remarque la présence d'une cavité coelomique (cc) au dessus du tube nerveux (tn).

Fig. B - Les c.g.p. se répartissent dans le mésenchyme (m). On note l'absence de toute cavité.

Fig. C - Le greffon s'est différencié en c.g.p., lame latérale (ll) et en somites surnuméraires (ss).

Fig. D - Vue de détail de la fig. C. L'îlot gonocytaire, bien individualisé, se situe entre la cavité coelomique (cc), limitée par une lame latérale (ll), et les somites surnuméraires (ss).
nd, nageoire dorsale ; s, somites.

Réactions obtenues après transplantation de mésoderme latéral présomptif de jeune gastrula.

Fig. E et F - Des c.g.p. se sont différenciées au contact d'une lame latérale.
nd, nageoire dorsale ; ll, lame latérale ; tn, tube nerveux ;
s, somites ; c, corde.

Les figures A, B, C, E et F sont à la même échelle.

