

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ DE LILLE
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE D'ODONTOLOGIE
FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE

ANNÉE 1977

THÈSE N°

THÈSE

POUR LE
DIPLOME DE DOCTEUR DE 3^me CYCLE
EN SCIENCES ODONTOLOGIQUES



Présentée et soutenue publiquement

le 20 OCTOBRE 1977

par

Jean DECOOL

CULTURE IN VITRO D'EMBRYONS DE SOURIS AU 8^me JOUR : STADE
PREMIERS SOMITES

JURY

MM. le Professeur M. DURCHON, Président
le Professeur A. DHAINAUT, Assesseur
le Professeur G. THILLOY, Assesseur
le Professeur M. HERITIER, Assesseur

A mon Président de Jury

Monsieur le Professeur M. DURCHON

*Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille
Membre Correspondant de l'Institut*

*En hommage reconnaissant pour l'accueil, sans restriction,
que vous m'avez réservé dans votre laboratoire.*

*Vous avez accepté, malgré vos lourdes charges, de diriger
ce travail et d'en assurer la correction.*

*Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de
cette thèse, veuillez trouver ici l'assurance de ma
très respectueuse reconnaissance.*

Monsieur A. DHAINAUT

Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Techniques
de Lille

Vous m'avez toujours manifesté votre compréhension. J'ai
apprécié votre compétence et bénéficié de vos conseils. Vous me faites
le grand honneur de juger cette thèse. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur G. THILLOY

Docteur en Chirurgie Dentaire

Docteur de 3^{ème} cycle de Sciences Odontologiques

Chef du Département d'orthopédie dentofaciale

Voici bien des années que j'ai pu apprécier la valeur de votre travail et de votre enseignement.

Malgré les nombreuses charges liées à vos fonctions, vous avez accepté de juger cette thèse.

Je vous en remercie sincèrement et vous assure de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur HERITIER

Docteur en chirurgie dentaire

Docteur de 3ème cycle de Sciences Odontologiques

J'ai pu apprécier la valeur de vos connaissances dans un domaine qui nous est commun.

Vous m'avez fait bénéficier de la qualité de votre technique.

Vous m'avez donné vos conseils et votre temps.

Vous avez naturellement accepté de siéger dans mon jury

Je vous en remercie bien sincèrement.

Monsieur le Professeur LEPERS

Docteur en Chirurgie dentaire

Docteur de 3^{ème} cycle de Sciences Odontologiques

Chef du Département de prothèse à la Faculté de Chirurgie dentaire de Lille

Vous m'avez toujours manifesté beaucoup d'attention. Vous avez, par vos conseils, guidé mes débuts professionnels. Puis vous m'avez accueilli dans votre service de prothèse où la qualité de votre technique donne une si grande valeur à votre enseignement.

Votre façon d'être a transformé en amitié les liens unissant les membres de votre service.

Vous me faites un grand honneur en acceptant de vous associer aux membres de mon jury.

Je vous en remercie sincèrement et vous assure de mon profond dévouement.

Monsieur le Professeur JUSTIN

Professeur de dentisterie opératoire

Docteur de 3ème cycle de Sciences Odontologiques

Assesseur de la Faculté de Chirurgie dentaire de Lille

*Vous m'avez toujours aidé avec spontanéité. J'ai apprécié
votre disponibilité à mon égard.*

*Je vous prie de croire à l'expression de mes vifs
remerciements.*

Monsieur le Professeur DEBAILLEUL

Docteur en Médecine

Professeur de dentisterie opératoire

Chef du service de dentisterie opératoire de la Faculté de

Chirurgie dentaire de Lille

Assesseur à la Faculté de Chirurgie dentaire de Lille

J'ai apprécié l'intérêt que vous portez à mon travail.

Votre compétence professionnelle et votre sens du contact humain ont toujours soulevé mon admiration.

Je vous remercie sincèrement pour tous les services que vous m'avez rendus.

*à tous mes maîtres chirurgiens dentistes et stomatologistes de l'Ecole
dentaire de Lille*

Monsieur le Professeur G. CARLIER

Monsieur le Docteur J. SOLEIL

Monsieur C. PORTEBOIS

Monsieur J. BERTRAND

Monsieur V. DEHOUCK

En témoignage de ma reconnaissance.

A la mémoire de Monsieur M. LEMAIRE

Directeur de l'UER d'odontologie de la Faculté de Lille

En reconnaissance des immenses services rendus à l'odontologie.

A mes maîtres de l'Université des Sciences et Techniques de Lille

Monsieur le Professeur F.SCHALLER

Monsieur le Professeur E.VIVIER

Monsieur A.BART, Maître de Conférences

Madame N.DHAINAUT

Monsieur C.HERBAUT

Monsieur J.LEMAIRE

Monsieur J.MALECHA

*Je les remercie pour la haute qualité de leur enseignement.
A tous mes amis chercheurs et enseignants de Biologie Animale
pour leur promptitude à rendre service.*

*A Monsieur le Professeur KREMBEL et Monsieur CARDON de Biochimie
dont j'ai sollicité l'aide et les conseils, qu'il reçoivent ici
l'expression de ma gratitude.*

A Monsieur le Professeur M.GOLDAERT

Agrégé de stomatologie

Docteur de 3ème cycle de Sciences odontologiques

Professeur de catégorie exceptionnelle

Chef du service de pathologie et thérapeutique dentaire à

L'UER d'odontologie de Lille

En témoignage de ma respectueuse considération

A tous mes collègues enseignants de l'U.E.R. d'odontologie de Lille

Messieurs les Professeurs
Messieurs les Assistants
Messieurs les Attachés
Messieurs les Vacataires

Je les prie de trouver ici l'expression de ma sincère
considération

A Madame HIMPENS

Madame BONET

qui ont assuré la dactylographie et la reproduction de ce
travail. Je les remercie de leur compétence et de leur bien-
veillance.

A Monsieur G.HIMPENS dessinateur, Monsieur LAZARECKI photographe,

j'adresse mes remerciements pour la qualité de leur collaboration.

A Madame MEUNIER

Mademoiselle CLERMONT

en remerciement pour les multiples préparations de produits et
de matériel d'expérimentation.

S O M M A I R E

1 - Introduction	p.1
2 - Développement de l'embryon de souris au 7,8,9ème jour de gestation	p.2
3 - Historique	p.4
4 - Principe des cultures organismotypiques	p.11
4.1. - Les milieux synthétiques	p.11
4.2. - Les milieux naturels	p.12
4.2.1.- Le liquide amniotique	p.13
4.2.2.- Les extraits embryonnaires	p.14
4.2.3.- La membrane chario-allantoïdienne	p.14
4.2.4.- Le sérum	p.14
5 - Matériel et Méthodes	p.15
5.1. - Préparation des embryons	p.15
5.2. - Détermination de l'âge des embryons	p.16
5.3. - Interprétation des résultats	p.16
6 - Expérimentation - Résultats	p.17
6.1. - Culture sur la membrane chario -allantoïdienne	p.17
6.1.1.- Technique opératoire	p.17
6.1.2.- Résultats	p.18
6.1.3.- Discussion	p.18
6.2. - Culture en milieu liquide	p.19
6.2.1.-Technique opératoire	p.19
6.2.2.- Résultats	p.21
6.2.2.1. Le liquide de Rinaldi modifié	p.21
6.2.2.2. La solution KRB modifiée	p.21
6.2.3.-Discussion	p.22
6.3. - Culture en milieu biphasiques	p.23
6.3.1.-Technique opératoire	p.23
6.3.2.-Résultats	p.25
6.3.2.1.Etude de l'action de différents sérums sur le développement des embryons de souris	p.25
6.3.2.2.Développement des embryons de souris en fonction de la phase semi-solide du milieu de culture	p.25
6.3.2.3.Développement des embryons en fonction de la pression osmotique	p.26

6.3.2.4. Développement des embryons en fonction de la concentration en ions hydrogène	p.26
6.3.2.5. Développement des embryons en fonction de l'âge	p.27
6.3.2.6. Observations histologiques	p.27
7 - Discussion	p.31
8 - Conclusion	p.32

1 - INTRODUCTION

L'inaccessibilité de l'embryon à l'intérieur du tractus génital de la mère constitue un des principaux obstacles à l'étude de l'embryologie des mammifères.

Le sein maternel représente un environnement complexe, soumis à une régulation précise.

Ceci explique les grandes difficultés qui ont accueilli les chercheurs essayant de reconstituer artificiellement un milieu favorable au développement *in vitro* des embryons de mammifères.

Les résultats de ces recherches sont restés longtemps partiels et surtout limités à certains stades très brefs du développement : par exemple du stade 8 cellules au stade blastocyste (lapin, souris), ou bien du stade premiers somites au stade ébauche des membres (rat, souris).

Les progrès techniques de ces dernières années ont toutefois permis de cultiver "*in vitro*" sans interruption des embryons du stade deux cellules au stade des premiers somites (souris, HSU 1973). Au delà de cette barrière la culture est possible, mais pour des séquences très courtes : 48 ou 72 heures. Après le stade 15 somites, soit 9 jours de gestation chez la souris, seuls, des fragments d'embryons sont cultivables pendant des durées assez longues : 8 jours et plus.

Il faut dire que chaque phase du développement correspond à des exigences particulières de l'embryon et qu'un milieu donné ne peut convenir que pour une courte période du développement. On rencontre ainsi différentes barrières ; fécondation, stade deux cellules, stade blastocyste, implantation dans l'utérus, stade des premiers somites.

Nous nous sommes attachés à la mise au point d'un milieu de culture favorable à la survie et à la différenciation d'embryons de souris de 8 jours (stade 0 à 15 somites).

Ce choix nous a été dicté par deux raisons :

1 - Ce stade comprend la phase initiale de l'organogénèse, celle qui est la plus riche en événements morphogénétiques.

2 - Peu d'auteurs se sont intéressés avec succès à cette étape du développement embryonnaire des mammifères.

2 - DEVELOPPEMENT DE L'EMBRYON DE SOURIS ENTRE LE SEPTIÈME ET LE NEUVIÈME JOUR DE LA GESTATION.

2.1. - L'embryon de 7 jours. Stade présomitique.

L'embryon de souris de 7 jours se présente sous la forme d'un cylindre transparent de 0,1 m/m de diamètre et de 0,4 m/m de longueur. Un léger sillon sépare l'extrémité antérieure de l'embryon, des tissus extra embryonnaires. C'est à ce stade que se forment l'amnios et la cavité amniotique.

Les premières cellules mésodermiques apparaissent à l'extrémité postérieure de l'embryon.

A 7 jours et demi, le sac amniotique se ferme.

La plaque neurale se délimite clairement; elle est creusée au milieu d'un sillon qui se confond plus en arrière, avec la ligne primitive. Devant cette plaque neurale : la plaque orale est constituée de deux couches d'épithélium et voisine avec le premier rudiment cardiaque.

La partie dorsale de l'embryon formée de cellules cubiques est en contact avec l'amnios. Vers l'extrémité antérieure, ces cellules deviennent cylindriques et forment l'ébauche de la tête.

On note la formation d'flots sanguins dans les parois du sac vitellin.

Puis une dépression apparaît dans l'endoderme, sous le repli amniotique antérieur, à la limite des zones embryonnaire et extra embryonnaire; elle constituera plus tard l'ébauche de l'intestin antérieur.

2.2.- L'embryon de 8 jours (premiers somites).

A l'examen externe, l'embryon de souris de 8 jours présente comme caractéristiques essentielles :

- a) l'approfondissement progressif du sillon neural.
- b) la flexion dorsale de l'embryon en lordose
- c) l'apparition des premiers somites.

Système circulatoire

Les flots sanguins sont apparus tout autour du coelome externe au stade précédent et chaque section histologique montre une activité mitotique importante des hémocytoblastes; il n'existe pas encore de connexion vasculaire avec les vaisseaux qui se développent dans le corps de l'embryon. Les artères vitellines se forment les premières; leurs ébauches, paires, donneront plus tard une seule artère impaire.

L'ébauche cardiaque se développe rapidement. Elle était déjà visible sur les coupes histologiques au stade précédent. En même temps, les cellules du mésoderme forment le tube endocardique en continuité avec le 1er arc aortique tout au long des aortes dorsales.

Vers la fin de cette période apparaît le 2ème arc branchial.

Tractus digestif.

L'ébauche de l'intestin antérieur est déjà présente au stade précédent. Son épithélium columnaire adhère maintenant à l'épithélium du plateau neural, sur une courte distance, et forme le plateau buccal.

Un peu plus tard (2 somites) apparaissent dans le même site : l'ébauche de la thyroïde et celle du foie; tandis qu'à l'autre extrémité de l'embryon se dessine la légère dépression de l'intestin postérieur.

Système nerveux central

La fermeture du tube neural se déclenche au niveau du 5ème somite et progresse à la fois vers les extrémités caudale et céphalique.

De ce côté le plateau céphalique se développe rapidement, et représente, en volume, la partie la plus importante de l'embryon. On y remarque deux dépressions : l'évagination optique à la partie antérieure, et la placode olfactive sous le rhombomère B à la base du cerveau.

2.3.- L'embryon de 9 jours (15 à 30 somites).

Après douze somites, l'organogénèse semble s'accélérer et nous assistons au début de la circulation placentaire, à la séparation du coeur et à ses premiers battements.

La cavité buccale va s'ouvrir et l'intestin antérieur se différencier.

Deux ébauches pulmonaires se forment avec des rudiments du larynx, de la trachée et des bronches.

La vésicule néphrétique et le canal néphrétique sont reconnaissables, ainsi que les cellules germinales, à partir de 15 somites.

La placode olfactive fait son apparition sous forme d'un épaissement de l'épithélium, avant la fermeture antérieure du tube neural.

Vers cette époque, commence probablement, la migration de cellules méséctodermiques de la crête neurale, qui seront entre autres formations, à l'origine des germes dentaires.

Ces 72 heures de la vie embryonnaire surprennent, tant par la rapidité que par la quantité d'interactions tissulaires primordiales auxquelles on assiste.

Cette période est mise à profit par les tératodologistes: en effet les injections d'antisérums^{ou de} produits tératogènes chez la souris gestante au 8ème ou au 9ème jour entraînent de profondes modifications de l'organogénèse. La tératologie peut difficilement analyser les phénomènes avec précision: elle reste une méthode globale.

Par contre la mise en culture des embryons d'amniotes est plus qu'une méthode pouvant faciliter l'observation, elle permet en outre d'entreprendre des expériences très précises qui seraient irréalisables dans le cadre naturel.

" Dans le passé chaque progrès de la technique de culture a été suivi par une avance rapide des connaissances en embryologie, et il y a beaucoup de raisons de supposer que la même séquence se reproduise", NEW 1966.

3 - HISTORIQUE

L'abondance des travaux publiés sur la culture des embryons de mammifères nous oblige à nous limiter à ceux qui ont servi de fil conducteur. à nos expériences.

Dans cette voie, le précurseur fut BRACHET (1912-1913). Il cultivait des oeufs de lapine dans un milieu composé de plasma ou de sérum de lapin additionné d'extraits embryonnaires.

A un stade plus tardif: post-implantation, les essais de culture d'embryons n'ont eu que des succès très limités. Pourtant, JOLLY et LIEURE (1938) obtiennent un développement modeste d'embryons de cobaye et de rat. Chez ces derniers, 37 % développent un axe embryonnaire et le coeur bat; mais seulement 9 % montrent une circulation sanguine. (Le fait n'a plus été rapporté depuis lors). Ces auteurs n'ont pas observé la formation d'autres ébauches: membres, langue, oeil, etc... Leur milieu de culture était constitué de sérum homologue de rat.

En utilisant au lieu de sérum, du plasma de rat et des extraits embryonnaires, NICHOLAS et RUDNICK (1934-1938) parviennent sensiblement aux mêmes résultats.

WADDINGTON et WATERMAN (1933) ont cultivé des embryons de lapins au stade 3 somites sur des caillots sanguins et ont obtenu dans les meilleurs cas des embryons de 6 - 9 somites, ce qui représente une demi-journée de développement au cours de la gestation normale. Ils ont observé des battements cardiaques mais pas de circulation sanguine.

CHANG (1949) expérimente les effets de différents sérums hétérologues sur le développement des oeufs de rat. Il cultive des embryons au stade deux cellules pendant 24 heures et ensuite compte le pourcentage de développements normaux d'après le nombre de divisions cellulaires.

Le sérum de lapin lui fournit les meilleurs résultats 84 %, le sérum de cheval 80%, de rat 75 %, de cobaye 71 %. Mais le sérum de chien ne permet qu'à 55 % des oeufs de se développer et celui de porc 45 %. Enfin avec les sérums, humain, de mouton, de boeuf ou de coq les résultats sont négatifs. CHANG pense que ces derniers renferment un facteur ovicide, qui, étant thermostable peut être inactivé par chauffage à 55°C pendant 30 minutes.

HAMMOND (1949) semble bien être le premier à obtenir quelques succès dans la culture de très jeunes embryons de souris : après 42 à 52 heures de culture, des sujets au stade deux cellules, atteignent le stade quatre cellules. Quelques sujets, partant du stade quatre cellules, atteignent le stade blastocyste et enfin tous les sujets de huit cellules mis en culture se transforment en blastocystes.

Son milieu était composé d'une solution saline, glucosée, enrichie de jaune et d'albumine d'oeuf de poule, sous pression d'air normale et incubés à 37°C.

Les solutions salines utilisées par HAMMOND avaient été préconisées par TYRODE (1910) et modifiées par EARLE (1934) GEY (1945) HANKS (1946). Elles diffèrent peu les unes des autres.

KREBS (1950) pense que les cellules mises en culture sont soumises aux lois générales du métabolisme. Il a donc l'idée d'ajouter aux solutions salines tamponnées certains produits intermédiaires du "cycle de KREBS". En effet le métabolisme du glucose ne se produit pas en une seule fois, mais par étapes successives, chacune d'elles étant réglée par une seule enzyme. Il est à noter que l'oxydation du glucose en CO^2 et H^2O fournit beaucoup plus d'énergie, pour une quantité de matériel donnée, que la transformation du glucose en acide lactique. A noter également que cette transformation peut se faire sans utiliser d' O^2 et en produisant quand même de l'énergie (20 fois moins). L'adjonction, aux milieux de culture, de produits intermédiaires de l'oxydation du glucose : lactate, pyruvate, fumarate et glutamate s'avère donc très favorable aux organes en culture.

Toutefois les cellules embryonnaires semblent avoir besoin de beaucoup d'"aerobic glycolysis" (PAUL, 1965). Ce qui soulève la question des besoins en oxygène des explants. Elle n'a pas encore reçu de réponse définitive. Il semblerait que les tissus embryonnaires, à la différence des tissus

adultes, peuvent se développer "*in vitro*" dans une atmosphère où l'oxygène n'est pas indispensable et peut d'ailleurs être remplacé par de l'Azote. Le gaz carbonique, un des produits ^{finaux} du métabolisme du glucose, peut être repris et combiné avec l'acide pyruvique pour former l'acide axaloacétique dans le cycle de l'acide tricarboxylique. Le gaz carbonique, au contraire de l'oxygène, semble nécessaire à la survie prolongée des cellules en culture. Enfin le système de fixation du gaz carbonique peut avoir comme rôle principal la régulation du pH intracellulaire HARRIS (1959).

WHITTEN (1956 - 1957 a,b). en utilisant le milieu de HAMMOND constate que le pH croît rapidement si on laisse le milieu exposé à l'air. En sachant que des embryons de 8 cellules ne se développent pas à un pH supérieur à 7,7, il réalise un milieu en partant de la solution saline tamponnée KREBS-RINGER et stabilise le pH aux environs de 7,1, en mélangeant 5 % de CO² à l'air constituant l'atmosphère du milieu. D'autres essais, cette fois en atmosphère d'azote le conduisent au même résultat, mais si l'azote est remplacé par l'oxygène, les embryons ne survivent pas.

WHITTEN apporte une autre modification à la solution KREBS-RINGER en remplaçant le chlorure de calcium par du lactate de calcium ou du lactate de sodium. Dans ce milieu 87 % des embryons de 8 cellules atteignent le stade blastocyste en deux jours de culture.

La méthode de culture de WHITTEN a permis à Mc LARREN et BIGGERS (1958) de transférer dans l'utérus de souris pseudo-gravides des blastocystes élevés en culture et d'obtenir 21 % de développement normal.

Cette même technique a également permis à TARKOWSKI (1961, 1964 a) et à MINTZ (1964) de démontrer, grâce à des blastocytes chimères réalisés "*in vitro*", les remarquables possibilités de régulation des jeunes embryons de souris.

BRINSTER (1963) a cultivé plusieurs milliers d'embryons de souris (stade 2 cellules) obtenus par la technique de super ovulation (RUNNER et PALM 1953). Son milieu de culture s'apparente à celui de WHITTEN : solution saline tamponnée de KREBS-RINGER, mais il réduit la proportion de NaCl à 91,5 parties et celles de CaCl² à 2 parties qu'il remplace par 8,5 parties de lactate de sodium isotonique, plus 1 mg/ml d'albumine de boeuf, 100 Uml de pénicilline et 50 ug/ml de streptomycine.

Au cours d'autres expériences BRINSTER (1965) se penche sur les besoins énergétiques des embryons et il conclut que le lactate, le pyruvate, l'oxaloacétate ou le phosphoenolpyruvate sont aptes à fournir l'énergie demandée; tandis que les sucres comme le glucose, le fructose, le ribose, et

d'autres encore sont inaptes. Il estime que le pH optimum est de 6,82 mais peut varier entre 5,9 et 7,8. La pression osmotique peut se situer entre 0,2002 et 0,3542 avec une valeur optimale de 0,2760 os

SMITH (1964) par des moyens différents : un milieu à base de gélose enrichie, sous atmosphère de 5 % CO₂ et 90% d'air, a cultivé pendant 18 à 20 heures des embryons de souris de 4 à 8 somites et a constaté leur évolution jusqu'au stade 16 somites, sans toutefois noter l'établissement d'une circulation sanguine. Pour faciliter les échanges entre le milieu et l'embryon, ce dernier était débarrassé du sac amniotique et du sac vitellin.

Vers la même période 1963 - 1964 NEW et STEIN cultivent également des embryons de souris et de rat au stade des premiers somites. Les embryons sont prélevés "in toto" avec l'amnios, le sac vitellin intacts ainsi que le placenta.

Le milieu de culture se compose : d'une phase semi-solide, constituée par un caillot de plasma de poulet et d'extraits d'embryons de souris ou de rat; d'une phase liquide, contenant des extraits d'embryons. Une boîte de Pétri, garnie de coton humide, renferme un verre de montre qui contient le milieu de culture. NEW incube ces chambres de culture à 37°C sous atmosphère 5% CO₂ et 90% O₂. Par cette méthode il réussit des cultures de 48 heures et constate que :

- 1 - Plus l'embryon est jeune, moins son développement est important.
- 2 - L'addition de CO₂ est bénéfique aux embryons de tous âges.
- 3 - L'addition d'O₂ est néfaste aux embryons jeunes (premiers somites).

Par ailleurs NEW (1966) a trouvé que les embryons de rat se développent aussi bien dans du sérum de rat que sur des caillots d'extraits embryonnaires. Il note au passage :

1 - L'absence totale de réactions immunologiques de l'embryon au sérum hétérologue de rat mâle ou femelle gravide ou non gravide.

2 - Les embryons de rat ne se développent pas dans les sérums d'autres mammifères.

BRINSTER (1965) entreprend des études qualitatives et quantitatives sur les besoins nutritifs "in vitro" des embryons de souris. Il cultive des embryons au stade deux cellules par séries de 12, et il évalue le pourcentage de ceux qui se développent jusqu'au stade blastocyste normal après trois jours de culture. En faisant varier la composition du milieu, il apprécie la valeur nutritive de différentes protéines, il peut déterminer également la valeur optimale de pression osmotique et du pH. Les résultats de ces travaux qui ont porté sur plusieurs milliers d'embryons indiquent que :

1 - Les blastocystes s'accommodent d'une pression osmotique comprise entre 0,200 et 0,354.

2 - La concentration d'ions hydrogène proche de 6,82 apparaît comme la plus favorable, toutefois les blastocystes admettent un pH étagé entre 5,87 et 7,78.

3 - Les blastocystes ne se développent pas dans un milieu dépourvu d'acides aminés qu'ils sont incapables de synthétiser.

Le sérum albumine de boeuf peut, à lui seul, assurer les besoins des embryons.

La suppression dans le milieu d'un seul acide aminé n'empêche pas le développement, seule l'absence de cystine réduit considérablement le nombre de blastocystes.

Il faut rapprocher ces résultats, surtout 1 et 2, de ceux de BRINSTER (1963).

New 1967 imagine un système qui permet de faire circuler continuellement le sérum autour des embryons, sous la poussée d'un mélange gazeux : 95 % O_2 et 5 % CO_2 à 38 °C. Ce perfectionnement conduit à des résultats intéressants des embryons de rat de 13 jours possédant 40 somites atteignent à la fin de l'expérience 55 somites, ce qui représente dans des conditions normales de gestation un développement de 1 jour. NEW 1970 - 1971.

COLE ET PAUL 1965 utilisent un milieu de culture à base de sérum humain et de sérum de veau enrichi de précurseurs d'acides nucléiques.

MULNARD 1964 utilise, pour la production d'un film cinématographique enregistrant en continu le développement d'un embryon de souris du stade 2 cellules au stade blastocyste, un milieu inspiré de WHITTEN 1957 et BRINSTER 1963-1965. La modification porte sur la teneur optimale d'albumine qu'il estime être de 5 mg pour 5 ml de liquide tamponné. Il précise de plus, qu'un mélange à parties égales de deux sérums-albumine : humain et bovin entraîne des résultats plus constants.

CLARKSON 1969 cultive des embryons de souris au stade premiers somites dans du sérum de rat. Il estime que le liquide de WAYMOUTH enrichi de 20 % de sérum de rat favorise mieux le développement que le sérum de rat seul.

WHITTEN 1971 publie les résultats de travaux sur les besoins nutritifs des embryons de souris cultivés "in vitro" au stade préimplantation. Il conclut que :

1 - Le mélange gazeux le mieux adapté comprend : 5 % O_2 , 5 % CO_2 et 9 % N_2 . Le mélange est introduit dans le milieu de culture par barbotage.

Pourtant les explants ont une facheuse tendance à former des vésicules que ce soit en atmosphère d'O² ou de N².

Il semble donc acquis, qu'aux stades jeunes les embryons de souris ont des besoins en oxygène assez faibles mais précis.

2 - La pression osmotique peut varier sans dommage de 250 à 290 mO ce qui ne semble pas en accord avec les observations précédentes de BRINSTER 1965. WHITTEN pense qu'une pression osmotique faible peut interférer avec une plus forte concentration d'O².

3 - Il situe le meilleur niveau de pH entre 7,2 et 7,3.

4 - Le tampon bicarbonate est indispensable. On peut le remplacer en partie par des phosphates : tris ou hepes, ce dernier n'est pas toxique mais si on le substitue en totalité au bicarbonate, on n'obtient pas de développement.

5 - Les ions calcium s'avèrent nécessaires à la cohésion cellulaire, ils sont donc indispensables au maintien de la masse embryonnaire.

6 - Le pyruvate est indispensable lors des premières segmentations de l'oeuf, puis, après la 3ème segmentation les besoins de l'embryon diminuent très sensiblement.

KOCHKAR 1974 mène à bien des cultures d'embryons de souris au stade 30 - 42 somites en employant un mélange à part égales de liquide de WAYMOUTH et de sérum de veau foetal.

HSU 1972-1974 fait réaliser un nouveau pas en avant à la culture " *in vitro*" des embryons de souris, en obtenant le développement continu d'embryons du stade 2 cellules au stade premiers somites. Il attribue sa réussite au fait d'utiliser un sérum différent adapté à chaque étape du développement embryonnaire.

1 - Du stade 2 cellules au stade blastocystes, les embryons sont explantés sur un milieu composé de Minimum Essential Medium d'EAGLE avec adjonction d'antibiotiques et de pyruvate.

2 - Lorsqu'ils ont atteint le stade blastocyste, les embryons sont transférés dans un milieu composé de MEM complété par 10 % de sérum de veau inactivé contenu dans une saignée dont l'intérieur est tapissé de collagène de tendon de rat, ce qui permet l'implantation des blastocystes, qui se fixent sur les parois de la saignée par l'intermédiaire du collagène, ceci sous atmosphère de 5 % CO², 5 % O² et 90 % N².

3 - Après trois jours de culture les blastocystes sont implantés dans le réseau de collagène ; le liquide nutritif est alors remplacé par une solution à 10 % de sérum humain.

Par cette méthode 1 à 3 % des embryons atteignent le stade des premiers somites.

De ce rappel historique nous pourrions conclure que la culture "*in vitro*" des embryons de mammifères et particulièrement de souris nécessite :

- 1 - Un apport de protéines ou d'acides aminés : la meilleure source semble être le sérum, surtout après le stade de l'implantation.
- 2 - Une pression osmotique réglée entre 250 et 290 Mo WHITTEN 1971.
- 3 - De satisfaire, selon l'âge des embryons, à un besoin croissant d'oxygène. Ces besoins presque nuls au stade 2 cellules WHITTEN 1970 peuvent atteindre 95 % au stade des premiers somites NEW 1970.
- 4 - Un apport énergétique sous forme de pyruvate BIGGERS, WHITTINGHAM et DONAHUE 1967, BRINSTER 1965.
- 5 - Un pH stable aux environs de 7,2 à 7,5 BRINSTER, WHITTEN 1970.
- 6 - Une suppression d'O² pour compenser le manque de circulation sanguine qui ne s'établit pas "*in vitro*".
- 7 - Des milieux de culture différents suivant l'âge des embryons HSU 1972 - 1974.

La lecture de ces travaux nous indique en outre :

- 1) qu'il est possible de cultiver des oeufs de mammifère et particulièrement de souris du stade deux cellules au stade blastocyste.
- 2) qu'au delà de ce stade et jusqu'aux premiers somites la culture "*in vitro*" est possible par séquences de deux ou trois jours.
- 3) qu'un développement continu à partir de la segmentation jusqu'à l'organisation d'un embryon comportant un certain nombre de somites n'est que difficilement réalisable.
- 4) qu'enfin la culture des embryons de souris du stade premiers somites et au delà n'a obtenu que des succès très limités.

On comprend pourquoi les travaux de morphogénèse expérimentale sur les mammifères supérieurs, au stade jeune sont peu nombreux. Nous pouvons citer : WADDINGTON et WATERMAN 1933, sur l'induction. TARKOWSKI, 1961, MINTZ 1962, BENOIT 1969 sur la régulation. JOLLY et LIEURE 1938, JOLLY 1939-40, NANOT et LE DOUARIN 1971, LE DOUARIN 1974 sur la formation du coeur et des vaisseaux.

Le but de notre recherche a été la mise au point d'un milieu de culture permettant le développement des embryons de souris du stade premiers somites et au delà.

4 - PRINCIPE DES CULTURES ORGANISMOTYPIQUES

" La culture organismotypique concerne des embryons complets ou des grands ensembles séparés de l'organisme". WOLFF 1965.

Cette culture peut être réalisée sur différents types de milieux. On distingue généralement les milieux synthétiques et les milieux naturels. Un milieu synthétique même très complexe ne peut assurer que quelques heures de survie aux embryons de mammifères, mais il est incapable d'assurer leur développement à moins qu'on y ajoute des liquides naturels.

Dans la pratique les deux types de milieux sont complémentaires, l'un servant à diluer, l'autre à enrichir.

Notre longue expérimentation (plus de 2.000 embryons ont été mis en culture) nous a permis de tester un nombre considérable de milieux de culture différents. Outre les milieux synthétiques, l'élément de base a toujours été recherché dans les milieux naturels tels que : liquide amniotique ou extraits embryonnaires. Pour cette raison, le chapitre les concernant revêt une certaine importance.

4.1.- Les milieux synthétiques

La composition des milieux chimiquement définis a été établie par essais successifs en additionnant des substances qui paraissaient favorables et sans danger pour la vitalité des tissus. Les composants doivent être soigneusement dosés pour obtenir un pH et une pression osmotique convenables. Certains ions inorganiques sont absolument indispensables. Ces liquides contiennent de plus une source d'énergie : le glucose. Ils renferment également des substances tampon .

Dès lors le liquide devient une solution saline tamponnée (Balanced Salt Solution : BSS) et sert de base à la confection de presque tous les milieux de culture. Employées seules, leur équilibre permet simplement de maintenir en survie les organismes; en effet leur carence en éléments nutritifs empêche le développement.

Les principales solutions utilisées sont : celle de TYRODE (1910); EARLE (1934); GEY (1945), et HANKS (1946), elles ne sont guère différentes l'une de l'autre.

Le liquide de Tyrode et celui de Gey ont l'inconvénient de précipiter très facilement leurs sels de Calcium, soit spontanément, soit par une simple élévation de température.

Le liquide de Earle doit être utilisé dans une atmosphère contenant 5 % de CO². C'est la solution la mieux tamponnée.

Le liquide de Hanks ne présente pas ces deux inconvénients; il peut être stérilisé par la chaleur et utilisé en atmosphère normale.

PAUL (1965) présente une formule où le bicarbonate trop instable est remplacé par le phosphate de sodium ou par le tris (tris-(hydroxyméthyl)amino-méthane) qui ne précipite pas, même en atmosphère normale.

Nous avons déjà cité précédemment la solution saline de KREBS (1950).

Pour les milieux synthétiques, une voie nouvelle est ouverte par FISCHER (1941), qui entreprend une étude systématique, qualitative et quantitative des acides aminés favorables aux cultures. Il choisit ces acides parmi ceux qu'il avait dénombrés dans le plasma par dialyse, et compose un milieu chimiquement défini.

En 1946 WHITE propose un milieu analogue.

A partir des formules de ces deux précurseurs, MORGAN, MORTON et PARKER ont publié en 1950 une formule plus complète, utilisée encore couramment aujourd'hui : le Tissue Culture Medium TC 199.

Par la suite la liste des corps entrant dans la composition des milieux chimiquement définis s'est allongée démesurément, et beaucoup d'entre eux se sont avérés inutilisables par les cellules en culture. EAGLE 1965 a donc entrepris un travail de simplification et il a déterminé de façon très précise les composants nécessaires à une croissance minimale des cellules.

WAYMOUTH (1958) complète ce milieu "a minima" par des éléments permettant une croissance optimale des cellules : Medium MB 752/1.

Il faut remarquer en conclusion que si ces milieux ne sont pas absolument universels ils constituent toutefois un élément de base bien équilibré et adapté à la culture de cellules, de tissus, ou d'organes.

Notons avec PARKER que si les milieux chimiquement définis assurent, par exemple, une maintenance quasi-indéfinie de colonies de fibroblastes de souris, c'est parce que ces colonies de cellules se sont finalement adaptées au milieu. Ce ne sera pas le cas pour des cellules normales.

4.2. - Les milieux naturels

En dépit de leur complexité, les milieux chimiquement définis ne peuvent servir que de solution de départ pour la culture de cellules, de tissus ou d'organes, dont ils assurent la survie pendant un ou deux jours. Pour aller au delà, il faut les compléter par adjonction de liquides naturels.

Ces milieux naturels représentent un facteur indispensable à la culture des tissus ou organes de mammifères supérieurs.

Leur rôle, en premier lieu, est d'établir un équilibre physique adapté aux tissus : pH et pO₂. en second lieu, ils doivent pourvoir aux besoins en substances chimiques complexes que les explants ne peuvent synthétiser eux-mêmes, à savoir : des amino-acides, des sucres, des vitamines, des hormones.

Même si, à l'avenir, on produit un nombre important de milieux synthétiques nouveaux, il est certain que les milieux naturels resteront encore longtemps le moyen le plus pratique et le moins onéreux de culture, et de toute façon seront difficilement remplacés pour les cultures de tissus ou d'organismes hautement différenciés.

Les milieux naturels proviennent de trois sources :

- 1 - le sang (caillot et sérum)
- 2 - les liquides histologiques : liquide amniotique, lymph, liquide céphalorachidien, humeur aqueuse.
- 3 - les extraits de tissus: extraits embryonnaires.

On pourrait en rapprocher également l'oeuf de poule en incubation (culture sur la membrane chario-allantoïdienne

Nos recherches ont été effectuées à l'aide des quatre milieux naturels suivants :

- 1 - Le liquide amniotique LA
- 2 - Les extraits embryonnaires
- 3 - La membrane chario-allantoïdienne CAM
- 4 - Le sérum

4.2.1.- Liquide amniotique

Le liquide amniotique le plus fréquemment utilisé est d'origine bovine. Mais comme il s'avère tout à fait impropre à la culture d'embryons de souris, nous avons préparé du LA. de souris.

Son pH : 7,4, est très bien ajusté mais la pO₂:275 est basse. Il est cependant bien adapté à la culture de cellules foetales, THIEDE 1966. Le liquide amniotique humain est très propice à la culture de cellules humaines, MOORE, 1967 et aussi à la culture de lignées de cellules de rat ou de souris, où, dans chaque essai, on obtient une mono-couche de cellules en 5 à 7 jours GRAY 1971.

Chez la souris, la pression osmotique du LA reste stable jusqu'au 9ème jour de la gestation, puis décroît progressivement jusqu'à la fin de la grossesse à mesure que diminue sa teneur en sodium tandis que les taux d'urée et de créatinine augmentent régulièrement.

La différence de composition entre le LA et le plasma maternel s'accroît au fur et à mesure que le terme approche. Nous avons donc choisi de prélever avant le 14ème jour de gestation, parce qu'à cette date le volume de l'amnios correspond à la moitié du volume du sac embryonnaire et que de plus le rein de l'embryon n'est pas encore fonctionnel; le LA ne contient que fort peu de catabolites.

4.2.2. - Les extraits embryonnaires

Les extraits embryonnaires apportent aux tissus en culture, outre les protéines usuelles, la fraction de nucléo protéines à poids moléculaire élevé que ne peuvent pas fournir les milieux synthétiques.

Les extraits embryonnaires lyophilisés présentés dans le commerce se sont tous révélés toxiques pour les jeunes embryons de souris. Nous avons donc préparé des extraits embryonnaires de souris de 9 jours. Les difficultés matérielles nous ont empêché de préparer des extraits d'embryons plus jeunes.

4.2.3. - La membrane chario - oïllantoïdienne

Dès le 11ème jour de développement les embryons de souris peuvent être transplantés avec succès sur la MCA d'oeuf de poule. Entre le 8ème et le 18ème jour d'incubation, l'oeuf est propice aux transplantations et peut assurer le développement.

4.2.4. - Le sérum

Le sérum est le liquide naturel le plus utilisé pour la nutrition des organes en culture.

Les tissus embryonnaires ne sont que très peu sensibles aux phénomènes immunologiques et peu leur importe l'emploi d'extraits homologues ou hétérologues ou bien même la provenance d'espèces différentes. Pourtant un certain nombre de sérums sont toxiques. Un sérum autologue peut être aussi toxique qu'un sérum hétérologue quelque soit son origine (PAUL, 1955).

Nous n'avons guère obtenu de succès par l'emploi de sérums de cheval, de coq, de veau foetal, de boeuf qui semblent tous inhiber le développement des jeunes embryons.

Par contre le sérum de souris a été utilisé avec satisfaction. Le sérum est séparé du caillot par centrifugation de préférence à la filtration qui semble retenir certains facteurs favorables à la croissance.

Avant usage, il est utile de tester la toxicité éventuelle de ce produit par un essai de culture avec des tissus embryonnaires de même âge. En effet un sérum peut être toxique pour certains tissus et non toxique pour d'autres. Il semble que, dans une certaine mesure, l'on puisse réduire cette toxicité en mélangeant les sérums d'un grand nombre de donneurs.

De même une conservation prolongée (quelques mois à - 20°C) favorise le développement des cultures

Certains auteurs préconisent de réduire les facteurs anti-croissance par chauffage à 65°C pendant 35 minutes. Ce procédé appliqué, en particulier aux sérums de haute toxicité reconnue, n'atténue pas leur défaut. Seule une très longue conservation permet de supprimer le facteur inhibiteur de développement. Après ce traitement un sérum toxique peut être utilisé sans danger quelques mois plus tard.

Quel est le facteur ?

5 - MATÉRIEL ET MÉTHODE

5.1. - Préparations des embryons

Toutes nos manipulations ont été effectuées sur des souris albinos (SWISS).

Dans des cages séparées, un harem de cinq femelles et un mâle est réuni à la fin de l'après midi. Le lendemain matin à 8 heures l'observation du bouchon vaginal désigne les femelles fécondées pendant la nuit; ce jour est considéré comme le jour zéro de la gestation avec une possibilité d'erreur de six heures en plus ou en moins.

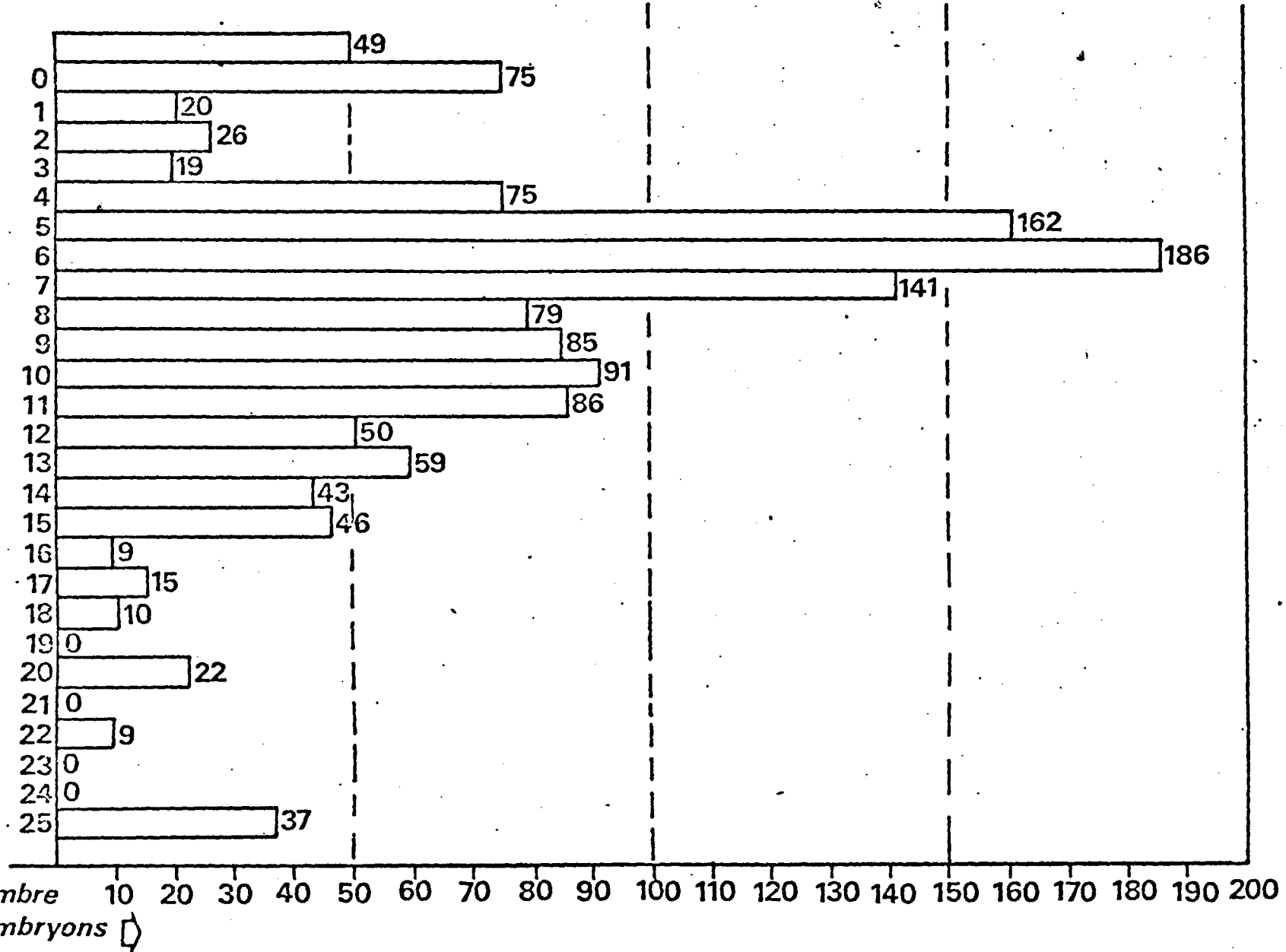
Les femelles sont sacrifiées, selon les besoins, au 7ème ou 8ème jour, par dislocation des vertèbres cervicales. Deux incisions longitudinales parallèles aux crêtes mammaires sont pratiquées, la peau de l'abdomen est excisée, puis la paroi abdominale. Les cornes utérines sont facilement reconnaissables à leur couleur rouge sombre; elles sont prélevées, rincées avec une BSS et déposées dans une boîte de Pétri contenant la même solution.

La dissection de l'utérus est conduite sous la loupe binoculaire. La difficulté est d'extraire les embryons de l'utérus sans les léser; leur volume est faible (0,1 m/m x 0,5 m/m), leur consistance est quasi nulle et de plus il règne une forte pression dans l'utérus due aux contractions. Si la membrane déciduale est ouverte d'emblée en même temps que la paroi utérine l'embryon se trouve violemment expulsé et souvent endommagé. Donc il est préférable d'inciser d'abord la paroi utérine pour rompre la force des anneaux musculaires et d'extraire la déciduale que l'on peut disséquer facilement en commençant par le côté le plus large puisque l'embryon se trouve à l'opposé. On enlève la membrane de Reitchert ce qui permet le prélèvement des organes choisis. Les embryons sont déposés dans des salières contenant 1,5 ml de liquide de HANKS. La dissection s'opère avec des pinces fines et des ciseaux de PASCHEFF *.

* Ciseaux MC 19 MORIA DUGAST, 108 Bd de la liberté Paris 6°.

Présomitique

N^{bre} de
somites



5.2. - Détermination de l'âge des embryons

Les nombreux prélèvements d'embryons à 8 jours de gestation nous ont permis de constater que tous n'atteignent pas le même stade en même temps. A l'extrême, un utérus peut renfermer des embryons échelonnés de 0 à 25 somites. Cela peut provenir du fait que tous les ovules ne sont pas fécondés au même moment; il peut s'ensuivre des variations dans le développement allant jusqu'à 20 heures (THEILLER 1972). Pour chaque expérience l'âge des embryons a été fixé d'après le nombre de somites. Ce repère est d'un contrôle facile, il semble moins sujet à variations que d'autres repères plus difficiles appréciables et moins constants. Statistiquement la plupart des embryons prélevés au 8ème jour se situent aux stades 5-6-7 somites (Tableau I); ce groupe renferme 489 embryons sur un total de 1374 embryons prélevés à cette date. Ceci est en accord avec les observations de WITSCHI (1962) : 8 jours = 1 à 4 somites et THEILLER 1972, 8 jours = 1 à 7 somites.

5.3. - Interprétation des résultats.

Nous venons de voir que la détermination de l'âge des embryons était établie d'après le comptage des somites au moment de l'explantation; or, nos mises en cultures ne comportent très souvent que la partie antérieure de l'embryon et le coeur, il n'est donc pas possible d'apprécier leur croissance par une numération des somites en fin d'expérience. Il nous a donc fallu choisir d'autres critères pour évaluer les résultats de ces cultures.

En premier lieu nous avons pensé à la mensuration des explants avant et après la mise en culture pour apprécier leur développement. Mais le peu de consistance des embryons provoque leur étalement; ils subissent des déformations importantes, et de plus ils peuvent être gonflés exagérément par des vésicules.

Nous n'avons donc pas retenu ce critère.

Par ailleurs le premier signe de différenciation d'un jeune embryon en culture est l'opacité; nous retenons donc ceux qui conservent une bonne translucidité et chez lesquels on peut reconnaître les organes par transparence. Il est possible qu'après quelques jours de culture un embryon n'ait pas grandi, mais que par contre son organogénèse ait suivi un cours normal, dans ce cas il reste translucide. L'observation histologique confirme cette appréciation.

Les battements cardiaques constituent un deuxième facteur positif. La date des premières contractions est imprécise : elle peut se situer entre le 7ème et le 9ème jour. Le rythme cardiaque est capricieux : il peut s'arrêter pendant de longues périodes puis reprendre, s'accélérer ou se ralentir

quelquefois sous l'influence de facteurs extérieurs tels que la température ambiante. L'action du froid peut le ralentir ou l'arrêter, au dessus de 37°C le rythme s'accélère. On sait donc que si les battements cardiaques constituent un facteur positif, leur absence n'est pas obligatoirement un facteur négatif. Un embryon de cet âge peut suivre un développement normal avec un coeur arrêté.

Si l'organogénèse du coeur se déroule en culture d'une façon comparable au développement normal on doit obtenir après quelques jours de culture une double contraction cardiaque : auriculaire et ventriculaire.

Nous avons retenu comme autre facteur d'appréciation : la forme des contours de l'explant en fin de période de culture. Un explant aux contours nets et bien délimités, sans cellules émigrées dans le milieu de culture, peut être considéré comme sain.

La présence de vésicules à l'intérieur de l'embryon doit être considérée comme une inadaptation au milieu. L'embryon se déforme et ses organes rejetés vers la périphérie dans un grand désordre, deviennent difficilement reconnaissables par suite des déformations; sauf l'ébauche cardiaque qui reste facilement identifiable grâce à ses pulsations. La présence de ces vésicules n'empêche donc pas la survie de l'explant, mais elle perturbe irrémédiablement l'organogénèse de l'embryon. L'apparition de vésicules a lieu dès les premiers jours de la mise en culture, elles ne cessent de s'accroître. La longue durée de nos cultures ne leur permet pas de rester inaperçues.

6 - EXPÉRIMENTATIONS - RÉSULTATS

6.1. - CULTURE SUR LA MEMBRANE CHAPIO-OLLANTOIDIENNE MCA

6.1.1. Technique opératoire

Nous avons essayé, avec des embryons de 8 jours, une technique déjà éprouvée pour des embryons de souris de 12 jours et au delà.

La méthode employée est celle décrite par HARRIS (1958), à ceci près que, les explants étant très petits, nous les plaçons dans une chambre de culture composée de deux filtres millipores collés de chaque côté d'un anneau de résine synthétique. Cette chambre est disposée sur la MCA au niveau de la dichotomisation de gros vaisseaux sanguins. Avant leur utilisation en culture les filtres millipores sont ébouillantés durant 10 minutes, puis rincés à l'eau distillée pour enlever toute trace des agents mouillants utilisés au cours de leur fabrication.

Les explants sont constitués de la partie antérieure des embryons avec le coeur. La partie postérieure a été sectionnée avant les somites.

TABLEAU 11

Survie des embryons de souris de 0 à 25 somites transplantés sur la membrane charlo allantoïdienne pendant 7 jours.

Nombre de somites	Nombre d'embryons	Survie	Dégénérescence	% de survie
25	18	13	5	81
20	17	3	14	0,3
15	7	3	4	45
12	8	5	3	62
10	50	14	36	28
8	41	2	39	5
7	57	16	41	28
5	16	0	16	0
4	45	3	42	7
3	3	3	0	100
2	2	0	2	0
1 - 0	1	0	1	0
TOTAL	265	62	203	24,8

Les oeufs de poule qui ont déjà huit jours d'incubation avant la transplantation, sont replacés immédiatement après dans l'incubateur à 38°C pour une durée de 7 jours.

6.1.2. - Résultats

Le tableau II indique le nombre d'explants mis en culture selon leur âge, et le nombre d'explants, recouverts après sept jours de culture, qui sont translucides, aux contours bien délimités, sans vésicules et dont le cœur bat.

Le résultat global indique un peu moins de 25% de survie. L'examen histologique confirme l'arrêt du développement des explants et aussi l'arrêt de l'activité mitotique des cellules dès les premiers jours de culture.

L'observation des embryons qui se sont très peu ou mal développés nous a permis de noter :

1 - L'établissement d'une vascularisation importante entre la MCA et l'embryon. Cette vascularisation anarchique bouleverse complètement l'anatomie de l'explant.

2 - Une calcification des explants 1/3 des embryons recouverts sont minéralisés. Les dépôts minéraux sont également importants sur les filtres millipores. Un traitement de déminéralisation par l'acide acétique ou l'acide chlorhydrique aboutit à leur dissolution, aucune trame organique ne subsiste.

3 - Environ 20 % des embryons présentent des vésicules.

6.1.3. Discussion

Malgré quelques succès la MCA ne semble pas être un milieu favorable à la culture et au développement des embryons de souris au stade des premiers somites. Les résultats montrent cependant un certain gradient de réussite en faveur des stades plus avancés (20 somites). Ceci semble indiquer que les besoins nutritifs de l'embryon varient après 20 somites.

Les pourcentages indiqués n'ont qu'une valeur relative. Les cas présentés sont trop nombreux pour établir une statistique surtout pour les groupes 1 - 2 - 3 - 12 - 15 somites. Les cultures sur la MCA semblent être soumises à la loi du tout ou rien, car sur un même oeuf, soit tous les embryons survivent, soit tous dégénèrent, ce qui explique les pourcentages élevés des groupes 3 - 12 - 25 somites.

La présence de vésicules kystiques montre que la pression osmotique de la MCA n'est pas adaptée à celle des embryons de souris surtout aux stades jeunes.

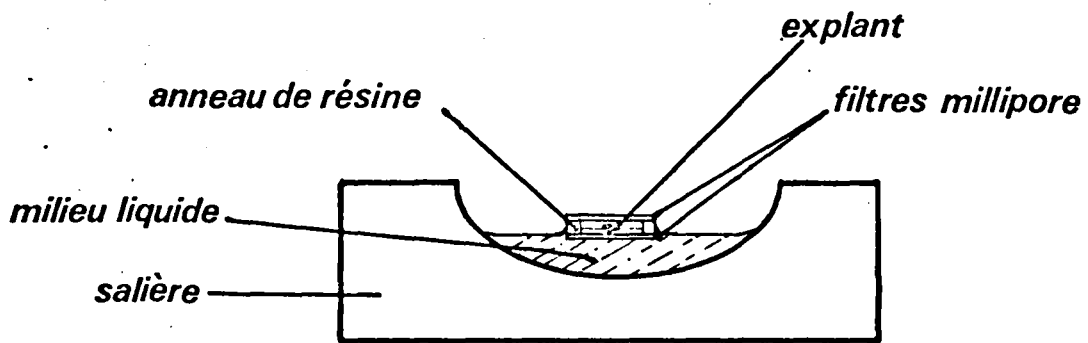


fig. 3

La vascularisation ne doit pas être interprétée comme une connexion entre les systèmes circulatoires de l'embryon et de la membrane mais plutôt comme la formation d'une tumeur angieuse.

Les amas de sels minéraux observés, soit sur les explants, soit sur les filtres millipores, n'ont pas de structure organisée et ne correspondent pas à la formation d'os ou de cartilage mais simplement à la précipitation de sels minéraux. Il serait peut être intéressant d'observer comment ces dépôts s'organiseraient en présence d'une trame organique déminéralisée d'os, de cartilage ou de dentine gréffés *in situ*.

6.2. - Cultures en milieu liquide

Nos premières cultures en salières avaient été réalisées sur un milieu semi-solide type WOLF - HAFFEN.

Comme nous l'avons déjà remarqué à propos des cultures sur MCA, la très faible consistance des embryons de souris de 8 jours, ne leur permet pas de maintenir des formes normales. Sur ces milieux trop fermes ils ont tendance à s'étaler à la surface de la gélose. Il s'en suit des déformations très importantes qui entravent l'organogénèse et rendant pratiquement impossible l'analyse histologique.

Par contre sur des milieux liquides la culture des blastocystes de mammifères se pratique avec succès.

Nous avons donc tenté d'utiliser ce moyen en l'adaptant à nos besoins. Or dès les premiers essais, il s'est avéré que, sans doute par manque d'oxygène la survie des explants ne dépasse pas 48 heures dans un milieu liquide. Nous avons donc essayé de maintenir les explants à la surface du milieu nutritif, mais dans une quantité suffisante de liquide pour permettre leur développement, sans subir de déformation et faciliter en même temps les échanges gazeux.

CHEN, 1954 a cultivé, le premier, des organes à la surface d'un milieu liquide en les plaçant sur un morceau d'acétate de cellulose flottant à la surface d'un milieu synthétique.

Une grille de métal inoxydable effleurant la surface du liquide a été imaginée par TROWELL 1954 et s'est substituée à la technique de CHEN.

6.2.1.- Technique opératoire

Nous avons utilisé comme élément flottant les chambres de cultures décrites précédemment. Elles offrent l'avantage de nous restituer l'explant en entier à la fin de la période de culture. En effet les tissus embryonnaires ont tendance à s'enchevêtrer sur le support fibreux et il est très difficile de les séparer. La chambre de culture est disposée sur un support en fil d'acier inoxydable, ce qui lui permet de rester à la surface,

tout en étant rempli de liquide par capillarité; de plus il est largement exposé à l'atmosphère gazeuse environnante.(fig.3)

Composition des milieux

1) Le liquide de RINALDI 1959 repris par LE DOUARIN 1974 constitue l'élément de base de notre premier milieu de culture.

RINALDI présente deux formules :

a) le milieu de base composé de :

30 % de sérum de cheval

70 % de solution de Tyrode renfermant 0,5 % de glucose.

b) le milieu de croissance composé de :

10 % d'extraits embryonnaires de poulet 12 à 14 jours

20 % de sérum de cheval

70 % de solution de tyrode renfermant 0,5 % de glucose

A partir de ces milieux et en faisant varier les composants nous avons obtenu les meilleurs résultats avec la formule suivante :

20 % de sérum de veau foetal

10 % de sérum humain

70 % de solution de tyrode renfermant 0,5 % de glucose
et pH : 7,2.

2) Un second milieu type s'est inspiré des formules de : WHITTEN 1957, BRINSTER 1963, 1965 a à d; 1967. Ils ont été modifiés par MULNARD 1965, 1968, 1972. Tableau IV

Leur constituant principal est un liquide physiologique dérivé du KREBS-RINGER bicarbonaté auquel on ajoute un sérum ou du sérum-albumine de boeuf. Selon la formule indiquée dans le Tableau III, la préparation se fait à partir de solutions-mères préparées d'avance et conservées au réfrigérateur. La solution définitive doit être préparée extemporanément. La formule complète comprend donc :

- Solution physiologique 10 ml

- Sérum albumine bovine 50 ml

Au moment de l'addition de l'albumine il se produit une acidification rapide (virage du rouge phénol) mais par la suite le pH se réajuste seul à l'air libre.

Le milieu est stérilisé par passage à travers un filtre millipore GSWPO 13 de 45 μ sur un dispositif SWINNY monté sur une seringue.

Sans changer le liquide physiologique de ce milieu, nous avons fait varier les composants organiques,

TABLEAU IV

Liquide de BRINSTER 1967; KRB

	ml de Solution stockée	gr/ L	m M
NaCl	9, 15	6,975	119,72
KCl	0, 40	0,356	4,78
Ca Cl ₂	0, 10	0,189	1,71
NaH ₂ Po ₄	0, 10	0,162	1,19
MgSo ₄ 7H 20	2, 10	0,294	1,19
Na Co H ₃	0, 85	21,06	25,07
Lactate de sodium		11,47	10,15
Albumine de boeuf cristallisée		1.000	
Penicilline		100 UI/ml	
Streptomycine		50 mg/ml	
Rouge phénol	2, 8		

En premier lieu nous avons supprimé les antibiotiques : strptomycine puis pénicilline. En effet le prélèvement aseptique des embryons ne pose pas de problèmes; le seul risque d'infection peut provenir du vagin, il suffit de le séparer des cornes utérines. Ces dernières sont rincées plusieurs fois dans du liquide physiologique comprenant une forte dose d'antibiotiques : pénicilline 500 UI p.ml, puis disséquées dans du liquide physiologique.

En second lieu nous avons remplacé le sérum albumine de boeuf par l'un des produits suivants :

- Sérum humain
- Plasma de coq
- Extraits embryonnaires de souris de 9 à 14 jours
- Extraits embryonnaires de poulet de 9 jours
- Liquide amniotique de boeuf
- Liquide amniotique de souris de 12 à 14 jours
- Sérum de cheval

Nous ne retiendrons que les deux milieux qui nous ont donné les meilleurs résultats, soit :

- 1) Solution KRB 20 y
Sérum de veau foetal 2 y
Sérum de souris 2 y
- 2) Liquide amniotique de souris 10 y
Sérum de veau foetal 2 y
Sérum de souris 2 y

6.2.2. Résultats

6.2.2.1 - Liquide de RINALDI modifié

Le liquide de RINALDI modifié ne permet le développement que de 1 à 2 % d'embryons de souris de 8 jours pour une durée de 48 heures. Ce milieu ne représente qu'un système de survie sans développement appréciable.

6.2.2.2 - La solution KRB modifiée

Cette solution assure le développement de 30 % des embryons de 8 jours.

- . La durée des cultures a été de 96 heures
- . Les explants peuvent survivre trois semaines, mais leur développement devient nul au delà de quatre jours de culture.
- . Le muscle cardiaque se contracte sur un rythme irrégulier. Les contractions peuvent se maintenir plusieurs semaines.
- . L'examen histologique montre une organisation presque normale, mais les tissus sont peu denses et les mitoses rares.
- . Le coeur est formé d'un amas de cellules et on ne voit pas de cavité centrale ni d'ébauche tubulaire.

- . Il n'y a pas de circulation sanguine
- . Les cellules nerveuses de l'encéphale sont moins denses que celles d'un embryon normal.
- . Les ébauches d'organe : oeil, oreille, restent nettement différenciées

6.2.3. Discussion

Il faut noter tout d'abord que le liquide amniotique de souris peut remplacer le liquide physiologique sans modifier les résultats, il n'apporte pas non plus d'avantages appréciables.

Nous pourrions ensuite faire quelques remarques sur les mammifères de la phase protéique.

Le plasma de coq ainsi que les extraits embryonnaires de poulet ou de souris semblent toxiques pour les cultures d'embryons de souris. A la différence des plasmas, les sérums sont mieux tolérés, en particulier celui de veau foetal et surtout le sérum de souris. Cette observation a permis la mise au point d'autres milieux que nous étudierons plus loin.

La présence simultanée de deux sérums : veau et souris représente un facteur éminemment favorable.

L'augmentation de la concentration de l'un des sérums du milieu ne constitue pas un facteur favorisant le développement.

Nous avons retenu, pour nos expériences ultérieures, deux faits qui nous ont paru remarquables : un pH stabilisé entre 7,5 et 8,3 d'une part, et d'autre part une pression osmotique croissante jusqu'à 0,350 Mo étaient associés aux meilleurs résultats.

Ces résultats sont comparables à ceux d'autres auteurs ayant utilisé des milieux identiques.

Toutes les variations qualitatives et quantitatives que nous avons pu faire subir à ces milieux n'ont guère apporté d'amélioration. Il a donc fallu penser à choisir : d'abord un autre liquide physiologique mieux adapté et sans doute plus élaboré, et ensuite une nouvelle source d'éléments nutritifs, tout en conservant un pH déjà satisfaisant et sans craindre d'augmenter considérablement la pression osmotique.

Tous ces essais en milieu liquide ont porté sur la mise en culture de près d'un millier d'embryons. Les résultats modestes nous ont permis cependant d'en tirer les conclusions suivantes :

- 1- Un milieu liquide s'avère nécessaire au maintien de la morphologie et au développement.
- 2- La présence d'oxygène est indispensable aux cultures.

TABLEAU V

TC minimal medium Eagle Spinner Modified
composants par litre

L-Arginine	105 mg	Nicotinamide	1 mg
L-Cystine	24 mg	Pantothenate	1 mg
L-Histidine	31 mg	Pyridoxal	1 mg
L-Isoleucine	52 mg	Riboflavin	0,1 mg
L-Leucine	52 mg	Thiamine	1 mg
L-Lysine	58 mg	Bacto-Dextrose	1,0 g
L-Methionine	15 mg	Sodium Chloride	6,8 g
L-Phenylalanine	32 mg	Potassium Chloride	0,4 g
L-Threonine	48 mg	Magnésium Chloride	0,2 g
L-Tryptophane	10 mg	Sodium Phosphate	
L-Tyrosine	36 mg	Monobasic	1,5 g
L-Valine	46 mg	Sodium Bicarbonate	2,0 g
Choline	1 mg	Triple distilled	
Folic Acid	1 mg	Water	1000 ml
Inositol	2 mg		

- 3 - Les embryons ont besoin d'une double source de protéines; les plus appropriées sont le sérum de veau foetal et le sérum de souris.
- 4 - Les autres sources de protéines (plasma, extraits embryonnaires) sont toxiques.
- 5 - L'inaptitude des liquides physiologiques ou du liquide amniotique à assurer le développement des embryons jeunes.
- 6 - Un pH compris entre 7,5 et 8,3.
- 7 - Une pression osmotique qui peut être supérieure à 0,350 Mo

6.3. - Les milieux biphasiques

La difficulté que représente la construction des structures flottant à la surface des milieux liquides et les conclusions que nous avons tiré de nos expériences précédentes nous ont fait envisager de cultiver les embryons dans un milieu liquide réparti à la surface d'un milieu semi-solide à base de gélose (WOLFF et WOLFF 1952).

Il s'avère que la gélose à 1 % (7 parties pour une partie de GEY BSS) entraîne une migration des cellules des explants à la surface du milieu. Ceci indique la nécessité d'enrichir le milieu, par apport d'éléments nutritifs et élévation de la Po. On atteint la limite supérieure d'enrichissement lorsque les explants sont envahis ou déformés par des vésicules. Entre ces deux limites, nous verrons que la marge de manoeuvre est relativement importante, et que ces frontières s'élargissent encore si on conserve un pH stable.

6.3.1. Technique opératoire

ANIMAUX : Les embryons de souris obtenus selon la méthode décrite précédemment sont prélevés au 8ème jour de la gestation.

Pendant les manipulations ils sont maintenus dans la solution de Hanks. Dans la plupart des cas, seule la partie antérieure est prélevée, y compris l'aire cardiaque et sans les somites.

Les explants sont disposés dans des salières à la surface de la gélose et presque immergés dans le liquide nutritif. Les salières sont placées dans un Incubateur à 38°C. La température d'incubation peut varier sans dommage pour les embryons entre 35 et 41 °C.

MILIEU

On dispose dans chaque salière :

- | | |
|--|------|
| - TC MEDIUM 199 ¹ | 10 y |
| - TC Minimal medium EAGLE ¹ | |
| SPINNER modified | 5 y |
| - Sérum de veau foetal ¹ | 1 y |
| - Sérum de souris | 1 y |
| - eau bidistillée | 1 y |

TABLE VI
MORGAN, MORTON AND PARKER'S
MEDIUM No. 199* (1950)

	<i>Milligrams per 1000 ml.</i>		<i>Milligrams per 1000 ml.</i>
L-Arginine	70.0	Riboflavin	0.010
L-Histidine	20.0	Pyridoxine	0.025
L-Lysine	70.0	Pyridoxal	0.025
L-Tyrosine	40.0	Niacin	0.025
DL-Tryptophan	20.0	Niacinamide	0.025
DL-Phenylalanine	50.0	Pantothenate	0.01
L-Cystine	20.0	Biotin	0.01
DL-Methionine	30.0	Folic acid	0.01
DL-Serine	50.0	Choline	0.50
DL-Threonine	60.0	Inositol	0.05
DL-Leucine	120.0	<i>p</i> -Aminobenzoic acid	0.05
DL-Isoleucine	40.0	Vitamin A	0.10
DL-Valine	50.0	Calciferol (Vit. D)	0.10
DL-Glutamic acid	150.0	Menadione (Vit. K)	0.01
DL-Aspartic acid	60.0	α -Tocopherol phosphate	
DL-Alanine	50.0	(Vit. E)	0.01
L-Proline	40.0	Ascorbic acid	0.05
L-Hydroxyproline	10.0	Glutathione	0.05
Glycine	50.0	Cholesterol	0.2
Cysteine	0.1	Tween 80 (oleic acid)	20.0
Adenine	10.0	Sodium acetate	50.0
Guanine	0.3	L-Glutamine	100.0
Xanthine	0.3	Adenosine triphosphate	10.0
Hypoxanthine	0.3	Adenylic acid	0.2
Thymine	0.3	Ferric nitrate	0.1
Uracil	0.3	Ribose	0.5
Thiamin	0.010	Deoxyribose	0.5

* This medium also contains a balanced salt solution.

- HCL 0,5 M eau bidistillée 1 y
- Pénicilline 10 UI² 1 y
- Gélose 4 y

1) Le milieu 199 pour culture de tissu, mis au point par MORGAN, MORTON et PARKER (1950) est composé d'une solution saline balancée : solution de EARLE, d'acides aminés et d'oligo-éléments (Tableau VI). Ce milieu est acheté dans le commerce prêt à l'emploi. Les éléments instables, tels que glutamine et bicarbonate sont introduits immédiatement avant la stérilisation acquise par filtration et adjonction d'antibiotiques.

Po = 290

pH = 7,55

2) Le milieu minimum modifié de EAGLE et SPINNER pour culture de tissus est une adaptation de la formule de EAGLE 1950 (minimum essential Medium (MEM)). Si ce milieu est dépourvu de glutamine il apporte un complément au complexe vitaminique B du TC199 ainsi que du dextrose.

Po = 285

pH = 7,25

3) Le sérum de veau foetal lyophilisé est reconstitué dans du sérum physiologique (Reconstituting Fluid¹) po 410
pH 8,15

4) Le sérum de souris - Après anesthésie à l'éther, la prise de sang est effectuée sur vingt souris adultes, mâles et femelles, âgées de quatre à cinq mois, par section de l'artère carotide. Le sang recueilli est placé à + 4°C pendant 24 heures, puis centrifugé 15 minutes à 2.200 Tr.min. Le sérum recueilli en surface est stocké à - 20°C. Après quelques temps de conservation, un dépôt peut se former au fond du tube à essai, il est éliminé par une nouvelle centrifugation. Le sérum de souris peut être conservé mais à - 20 °C. Po 580
pH 7,25

5) L'eau bidistillée est obtenue à partir d'eau désionisée distillée deux fois dans un alambic de verre (PYREX). L'alambic est soigneusement rincé avant l'utilisation pour éliminer l'eau résiduelle qui risque de renfermer des ions Pb ou des endotoxines de bactéries. L'eau bidistillée se conserve dans des flacons de polyéthylène pour éviter une redissolution des sels métalliques en provenance du verre (HEALY 1954-1955).

6) Solution d'acide chlorhydrique dans l'eau bidistillée 0,5 M, permet d'élever à 8 la valeur du pH du milieu de culture. Cette valeur est mesurée avant l'adjonction de la gélose; en définitive il se trouve ajusté à 7,2; 7,3.

2- Laboratoire SPECIA 21 rue Jean Goujon 75360 PARIS

1- Reconstituting fluid DIFCO Laboratories Detroit Michigan USA

TABLEAU VII

Influence de différentes variations des composants du milieu type, sur le développement des embryons de souris (phase liquide).

1 - Sérum de cheval

2 - Sérum de veau foetal

3 - Sérum humain

4 - Sérum de souris

Sérums	Nombre d'embryons mis en culture	Développement	Survie	Nécrose
1	12	0	6	6
2	7	0	3	4
3	7	1	5	1
4	15	13	2	0
	<u>41</u>			
1 + 2	9	0	4	5
1 + 3	8	0	3	5
2 + 3	11	0	7	4
1 + 2 + 3	9	2	7	0
	<u>37</u>			
1 + 4	10	2	5	3
2 + 4	9	1	6	2
3 + 4	17	2	2	3
	<u>36</u>			
4 en solution dans				
TC 199	7	2	4	1
Eagle et Spinner	9	2	5	2
Earle	12	3	4	5
Tyrode	11	0	1	10
	<u>39</u>			
1 + Glucose	7	0	6	1
2 + Glucose	7	0	7	0
3 + Glucose	13	0	11	2
4 + Glucose	12	7	5	0
	<u>39</u>			

Les mesures de concentration en ions H est effectuée au pH mètre pour les composants du milieu. Les mesures pour le milieu gélosé sont établies par comparaison avec des échantillons phénolés scellés et conservés à - 20°.

7) La pénicilline n'a été utilisée que pour un petit nombre de manipulations : Spécilline G¹ flacons de 100.000 UI reconstitués dans la solution de EARLE 4 ml. 1 ml est prélevé et dissous à nouveau dans 5,5 ml de la solution d'EARLE.

8) Tous ces liquides sont mélangés selon les proportions indiquées, et on ajoute quatre gouttes de gélose dissoute par ébullition dans du liquide de Gey.

Ce milieu type a également servi de base pour d'autres expérimentations où l'on a remplacé certains composants e.g. sérum de boeuf, sérum de cheval ou sérum humain. Nous avons aussi fait varier dans certaines expériences les paramètres physiques tels que pH et Po.

6.3.2. - Résultats

6.3.2.1. Etude de l'action de différents sérums sur le développement des embryons de souris (phase liquide)

192 embryons ont été cultivés sept jours par groupe d'environ 40 sujets sur le milieu de base auquel ont été apporté les modifications indiquées au tableau. ^{VII} Elles consistent à utiliser des sérums différents seuls ou mélangés à d'autres sérums, soit dilués, soit enrichis de glucose.

Le développement des embryons est nul si on emploie des sérums provenant d'autres espèces.

Si on utilise deux ou plusieurs sérums dans un même milieu de culture le développement des embryons est nul.

En ajoutant aux sérums d'autres espèces 50% de sérum de souris, un petit nombre d'embryons se développent.

Le sérum de souris utilisé en dilution dans des solutions balancées ou dans des milieux synthétiques est également impropre à la culture.

L'addition de glucose aux différents sérums permet la survie à un plus grand nombre d'explants, mais n'assure pas leur développement. Dans ce cas, bien que les coeurs se contractent, l'embryon perd de sa translucidité et sa morphologie. Les organes ne sont plus identifiables à l'examen externe. Pourtant la survie peut atteindre trois semaines. Le développement n'est assuré que si le glucose est ajouté au sérum de souris.

6.3.2.2. Développement des embryons de souris en fonction de la composition de la phase semi-solide du milieu de culture.

7 séries d'environ 12 embryons ont été cultivées dans du sérum de souris mais en faisant varier la composition de la phase semi-solide

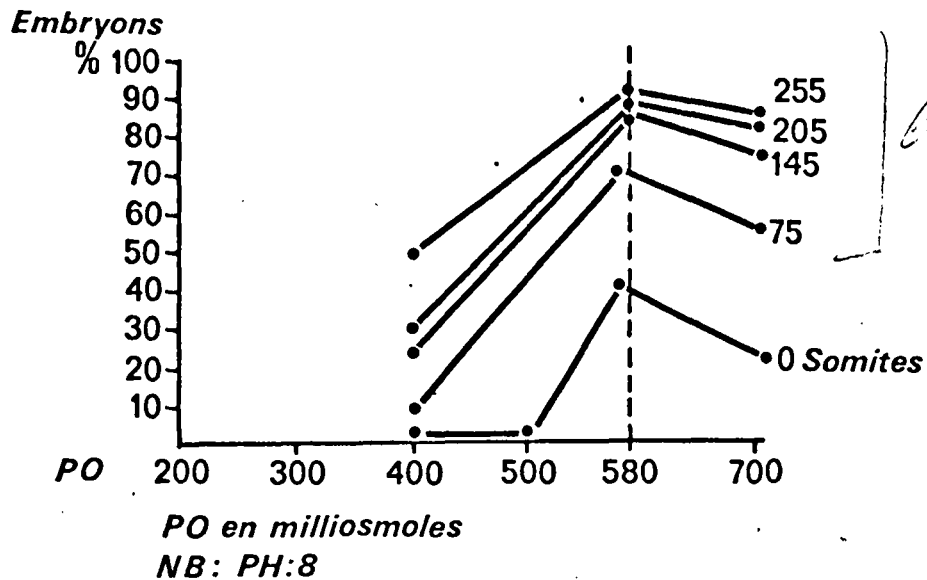
TABLEAU VIII

Développement des embryons en fonction de la composition de la phase semi-solide.

(âge moyen des embryons 7 somites).

Elément retiré du milieu type	Pression osmotique	pH	Nombre d'embryons	Développement	Survie	Nécrose
1- sans TC199	230	7,7	11	3	8	0
2- sans Eagle et Spinner	245	7,2	13	5	8	0
3- sans eau bitistillée	295	8,1	10	3	7	0
4- sans HCL	265	7,3	11	1	7	3
5- sans sérum de veau foetal	265	7,5	13	6	7	0
6- sans sérum de Souris	255	8	15	2	9	4
7- sans 1 et 2	285	8,3	16	8	7	1
			89	28	53	8

Figure 9 - Développement en fonction de la Po.



par suppression de l'un des composants.

La nécrose atteint plus facilement les explants dont le milieu ne contient plus de sérum de souris, ou dont le pH est fortement abaissé par suppression de la solution d'HCL. (voir Tableau VIII)

6.3.2.3. Développement des embryons en fonction de la pression osmotique.

WAYMOUTH (cité par WHITTEN 1970), a montré que les cellules en culture peuvent supporter des variations importantes de pression osmotique si le rapport calcium-potassium reste constant. Nous avons donc augmenté ou diminué la concentration de ces sels en conservant le même rapport. Le pH est maintenu très proche de 8 (fig.9).

Trois mesures sont faites : $P_o = 400 - 600 - 700$ avec 21 embryons de 0 - 7 - 14 - 20 - 25 somites.

Les embryons jeunes : 0 somite sont plus sensibles aux variations de P_o que leurs aînés.

Le meilleur développement a été obtenu, pour tous les stades, avec une $P_o = 580$.

6.3.2.4. Développement des embryons en fonction de la concentration en ions Hydrogène.

Quatre séries de 27 embryons âgés de 6 somites et quatre séries d'embryons âgés de 13 somites ont été mis en culture dans des milieux dont le pH était réglé à 7, 7,25, 8 et 8,5 (valeur mesurée avant la mise en culture).

Le meilleur développement s'obtient pour un pH : 8. quelque soit l'âge des embryons. Les tissus explantés sont plus sensibles aux variations de pH qu'aux variations de P_o (fig.10).

Figure 10 : Développement des embryons en fonction de la concentration en ions hydrogène.

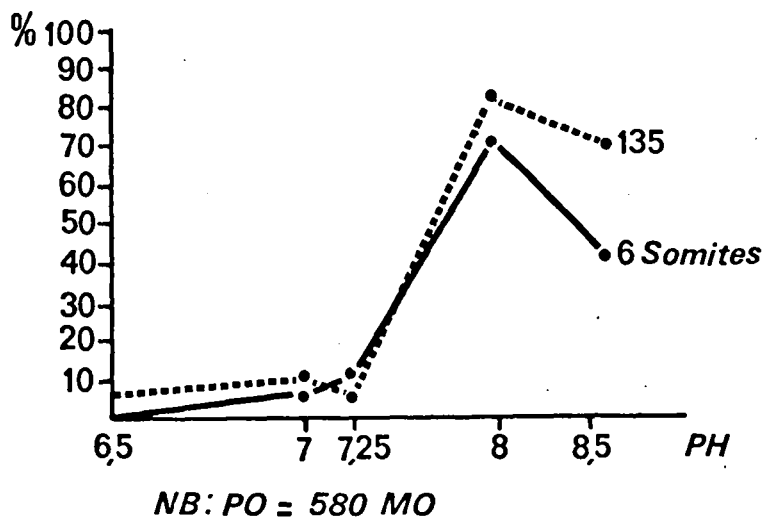
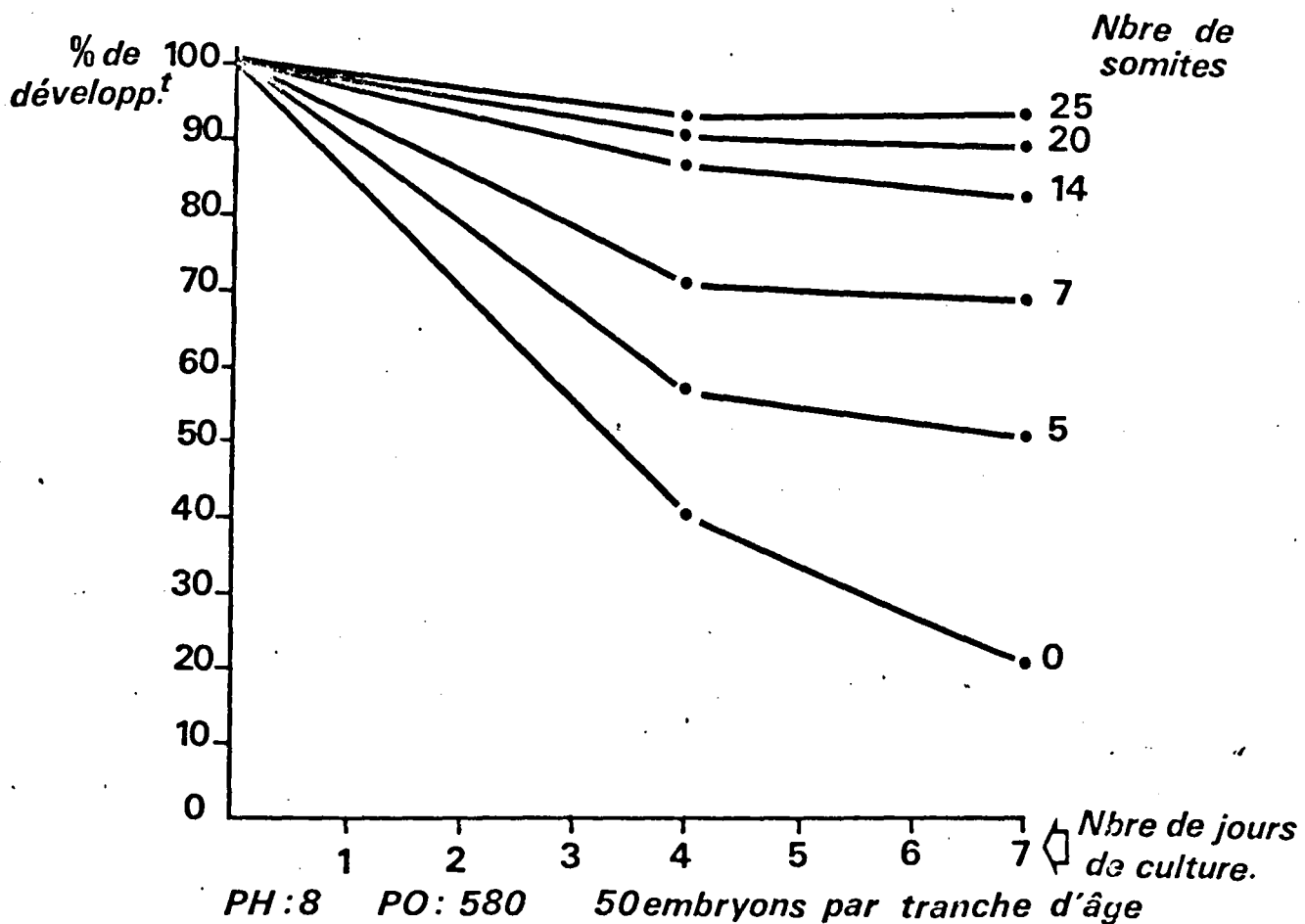


Figure 11 : Développement des embryons en fonction de l'âge



6.3.2.5. Développement des embryons en fonction de l'âge

En culture sur le milieu type, le pourcentage de développement croît avec l'âge des embryons. Ce milieu est plus favorable à la croissance des embryons les plus âgés. Les meilleurs résultats sont obtenus avec des embryons entre 14 et 25 somites (fig.11).

Pour les stades antérieurs à 0 somite : ovocylindre, le taux de développement est assez faible, les embryons présentent presque tous des vésicules, ce qui modifie considérablement leur organisation, pourtant certains organes se développent presque normalement; par exemple le cerveau, l'intestin antérieur, et surtout l'ébauche cardiaque qui devient contractile après quatre jours de culture.

6.3.2.6. Observations histologiques

L'examen histologique permet, par comparaison avec des embryons témoin de même âge, d'évaluer de façon précise le développement atteint par les explants à la fin de la période de culture.

On observe tout d'abord de grandes variations dans les formes générale de l'explant : ou bien la partie céphalique s'allonge ou bien elle devient sphérique. Ces déformations dues au manque de rigidité des tissus embryonnaires ne nuisent pas au développement des organes qui peuvent être facilement identifiés malgré leurs déplacements.

Dans leur grande majorité, les coupes ont été effectuées selon un plan sagittal, puisque les explants ont subi pendant la culture un aplatissement selon le même plan. Ceci permet d'observer plusieurs organes sur une même coupe.

1) Ebauche cardiaque

Nous avons déjà signalé l'inaptitude de notre milieu au développement normal de l'ébauche cardiaque qui se présente en fin de culture sous la forme d'un amas sphérique de cellules contractiles. Ces cellules sont très peu différenciées. Le tube cardiaque est inexistant ainsi que le bulbe aortique et le péricarde. On peut noter la présence de quelques cellules sanguines. Il n'y a pas d'indice de circulation. voir Planches II et IV.

Ces résultats restent identiques quelque soit l'âge des embryons mis en culture : présomitiques, premiers somites, 14 ou 20 somites.

2) Encéphale

A l'inverse de l'ébauche cardiaque, le tissu nerveux se développe d'une façon presque normale en culture, quelque soit l'âge des explants. D'ailleurs les crêtes neurales isolées à l'âge de 7 à 8 somites peuvent être cultivés avec succès durant sept jours.

St. 23
du 23
(le 23)
23 points
sur 23

Le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale ainsi que les rhombomères A et B sont facilement reconnaissables. L'ensemble du système nerveux conserve sa morphologie. On peut observer la formation et le début de la fermeture de la poche de RATHKE.

L'aspect des cellules nerveuses est semblable à celui des cellules normales d'embryons témoins, voir Planche III. et 7

Des cellules picnotiques peuvent être observées au sommet du diencéphale leur dégénérescence se poursuit et correspond à l'évolution normale de l'embryon de 11 à 12 jours.

3) Vésicule optique

La vésicule optique est nettement reconnaissable sur tous les embryons cultivés.

A partir de stades jeunes : 0 somite ou quelques somites, on peut obtenir en culture un développement de la vésicule optique correspondant au stade 30 somites. Cette étape est reconnaissable au début de l'invagination de l'ectoderme qui présidera à la formation du cristallin.

A partir d'embryons âgés de 7 somites, nous avons obtenu la première ébauche du cristallin : la vésicule cristallinienne. (voir planches VII et VIII)

A partir de 14 somites, un embryon cultivé 7 jours peut montrer la formation du cristallin et la fermeture de la vésicule optique qui survient, chez l'embryon normal, au stade 40 somites.

Après 7 jours de culture, les cellules formant le feuillet interne et le feuillet externe de la rétine, sont visibles et ne montrent aucun signe de dégénérescence ou de picnose. Seul le nombre des cellules mitotiques est inférieur à la normale.

4) Vésicule otique

La vésicule otique est ouverte, à l'âge où les embryons sont mis en culture. Nous la retrouvons fermée après 7 jours de culture (date normale de fermeture 24 somites). De plus, le canal endolymphatique est nettement visible ce qui correspond à un stade normal de développement de 36 somites. Les embryons atteignent enfin le stade 45 somites reconnaissable à ce que la vésicule otique développe l'utricule et la saccule : ébauches premières des canaux semi circulaires et de la cochlée. (voir planche II).

A l'instar des cellules du tissu nerveux et des tissus de la vésicule optique, les cellules de l'épithélium de la vésicule otique sont disposées en couches régulières, elles semblent bien adaptées au milieu de culture, aucun signe de dégénérescence n'est observable.

5) Le tractus digestif

Seule la partie antérieure du tractus digestif comprenant le stomodœum et l'intestin antérieur peut être observée sur les explants. La membrane bucco-pharyngienne s'ouvre à 16 somites, des vestiges de cette membrane peuvent persister jusqu'à 25 somites.

Vers le 8ème jour (14 somites) les cellules de l'épiblaste stomodœal situé juste en avant de la membrane pharyngienne deviennent cylindriques. Cette ébauche se trouve à une faible distance de la paroi diencéphale. L'ébauche stomodœale s'invagine dans cette direction et forme la poche de RATHKE 10 jours 26 somites. La poche de RATHKE reste ouverte sur le stomodœum jusqu'au 11ème jour. Le diverticule se referme vers le 13ème jour. (voir planche V).

Tous ces événements morphologiques peuvent être observés sur les embryons en culture.

L'intestin antérieur pendant cette période ne subit qu'une évolution de forme, dirigée par une série d'épaississements mésoblastiques séparés par des sillons : les poches endoblastiques qui seront effacées par la suite.

Nous remarquerons l'épithélium unicellulaire qui le tapisse.

6) Culture d'ébauches mandibulaires isolées (premier arc branchial)

A° Des cultures de placodes buccales d'un âge inférieur à 10 somites ne produisent après 7 jours de culture qu'une masse informe de cellules mésodermiques entourées d'épiblaste sans signe de différenciation.

b) des cultures de bourgeons mandibulaires (premier arc branchial) au stade 12 somites ne se différencient pas en culture.

c) Des cultures d'ébauches mandibulaires (premier arc branchial) à partir du stade 13 somites différencient normalement une lame dentaire et des bourgeons dentaires au stade en cloche. (voir planches IX et X).

Discussion

1) Prélèvement des embryons

Dès nos premiers essais de mise en culture nous avons constaté que certains facteurs, dépendants de l'embryon lui-même, se sont montrés soit favorables, soit défavorables à la survie et au développement.

1) Facteurs défavorables

Un embryon entouré de ses annexes ne se développe pas dans nos milieux de culture.

La présence du placenta n'est pas propice au développement, même sous forme d'extraits ajoutés au milieu de culture.

La membrane de REITCHERT, mise en culture, a tendance à proliférer et à évoluer pour son propre compte, cela nous a semblé être un obstacle aux échanges entre l'embryon et le milieu de culture. Si on l'utilise comme support des explants, ses cellules émigrent et envahissent le milieu de culture.

En revanche, la membrane amniotique peut être conservée autour des embryons, cela n'apporte aucune entrave au développement, et permet, éventuellement, de maintenir ensemble, différentes parties d'explants.

2) Facteurs favorables

La partie antérieure d'un embryon, coupé en deux transversalement, se développe plus facilement en culture que la partie postérieure qui dégénère. (voir planche IV).

Cette particularité, déjà relevée par différents auteurs sur d'autres mammifères, est confirmée par GUNBERG 1976, qui remarque que le glucose et le mannose sont favorables au développement de la partie antérieure des embryons de rat, tandis que sur le même milieu la partie caudale dégénère. PIENKOWSKI 1974, souligne que les blastocystes de souris se développent mieux si on enlève la zone pellucide.

Par ailleurs la présence du coeur de l'explant, mis en culture, semble être un facteur éminemment favorable. Il est possible que les pulsations entraînent un brassage continu du liquide nutritif facilitant les échanges avec le milieu.

De plus, l'ébauche cardiaque représente une masse cellulaire importante; ceci est un facteur positif, si on considère que des parties trop petites d'embryons mises en culture dégénèrent ou bien évoluent vers la culture cellulaire. Ainsi, par exemple, un arc branchial très jeune ne peut se développer seul en culture, il survit mais ne se différencie pas. Le même arc branchial cultivé avec les tissus environnants peut se différencier facilement (voir plus loin).

DISCUSSION - CONCLUSION

La culture organotypique d'organes embryonnaires en cours de différenciation ne semble plus poser de problèmes.

Par contre, la culture organismotypique d'embryons de Mammifères explantés aux jeunes stades n'a pas encore trouvé de solution.

Il apparaît que des données d'ordre biochimique ou ionique nous manquent pour pouvoir cultiver de jeunes embryons en dehors de l'organisme maternel.

Les expérimentations restent encore empiriques.

L'utilisation du milieu TC 199 ainsi que de la solution de EARLE semble contre-indiquée dans notre type d'expérimentation, puisque ces produits s'équilibrent normalement sous une atmosphère à haute pression de CO₂. Le milieu de WAYMOUTH 1956-1959 et la solution de HANKS dont le pH s'équilibre à l'air sembleraient mieux s'adapter. Différents essais sont en cours d'expérimentation.

Le renouvellement de milieu préconisé dans la technique traditionnelle des cultures ne semble pas favoriser le développement des embryons. HSU (1973), pense que le changement fréquent de milieu constitue un élément favorable à la différenciation normale de l'embryon pour deux raisons :

- 1 - élimination de l'action toxique directe des catabolites sur l'embryon,
- 2 - l'instabilité de certains facteurs essentiels à la différenciation qui exige un apport continuuel d'éléments frais.

Eu égard aux résultats de nos expériences, ces changements ne semblent pas favoriser le développement des explants. Nous avons pu vérifier que chaque modification importante du milieu exige de la part de l'embryon une nouvelle phase d'adaptation qui se traduit par un retard de développement.

D'après NEW et BRENT (1972), les anticorps et peut-être les catabolites, seraient absorbés uniquement par l'endoderme des embryons en culture ; seul ce tissu serait sensible à ces produits, et il aurait de plus la possibilité de les transformer par digestion. Les protéines résultantes seraient transportées vers l'embryon avec d'autres éléments nutritifs.

HISTOLOGIE

L'étude histologique topographique de nos cultures met bien en évidence la spécificité des milieu de culture et leur adaptation au développement des différents tissus.

Il existe en effet une sensibilité différentielle des organes vis-à-vis des facteurs exogènes. Les processus morphogénétiques (formation des plis céphaliques) requièrent moins d'aliments énergétiques que les processus de différenciation (histogenèse des vésicules optiques, des otocystes).

Des recherches sont entreprises pour déterminer les besoins nutritifs de l'ébauche cardiaque ce qui permettrait un développement harmonieux de cet organe.

HSU dès 1971 signale que des blastocystes mis en culture pendant 10 ou 14 jours forment des ilots sanguins et battements du coeur deviennent perceptibles. Ceci est confirmé par nos observations sur des cultures d'embryons d'âge présomitique. DIENKOWSKI (1974) décrit également la mise en route des battements cardiaques ainsi que la formation du tube neural à partir d'explants de même âge. Nous pouvons y ajouter la formation des vésicules optiques et otiques ainsi que celle du stomodeum. Il faut cependant noter que l'ébauche cardiaque obtenue en culture est très loin d'être fonctionnelle et que sa situation à la limite extra-embryonnaire laisse penser que nous sommes en présence d'un accroissement numérique des cellule précardiaques.

En ce qui concerne les autres organes : vésicules cérébrales, vésicule optique, vésicule otique, on peut considérer que sept jours de culture sur le milieu étudié conduisent à un développement de trois à cinq jours.

Le développement normal, en culture, des vésicules sensorielles optiques et otiques doit permettre des recherches ultérieures sur les interactions tissulaires qui déclenchent ou contrôlent l'histogénèse. Des travaux en cours nous permettent la culture de ces ébauches isolées aux stades postérieurs à 15 somites.

Les ébauches mandibulaires ne sont aptes à produire des tissus différenciés que si la culture est pratiquée avec des embryons de plus de 13 somites. Il semble qu'un facteur d'induction agisse au stade antérieur à 13 somites, c'est-à-dire au 8ème jour, et déclenche la différenciation de la lame dentaire et des germes dentaires. (La formation d'une paire de somite exige 1 à 2 heures THEILER, 1972).

CONCLUSION

Les expériences présentées dans ce travail nous ont démontré que :

1. Les embryons de souris des stades 0 à 20 somites se développent *in vitro* dans un milieu nutritif liquide spécifique (sérum de souris).
2. La pression osmotique du milieu doit se situer aux environs de 580 MO.
3. La pression en ions hydrogène de 7,25 est la plus favorable.
4. La présence de CO₂ n'est pas indispensable aux explants.
5. Le milieu utilisé permet le développement et l'histogénèse des vésicules cérébrales, des vésicules optiques, des vésicules otiques, et des germes dentaires.
6. A la période antérieure à 13 somites semble se déclencher le mécanisme inducteur aboutissant à la formation des germes dentaires.

PLANCHE 1

Embryons cultivés durant 7 Jours.

- 1 - Embryons mis en culture au stade 7 somites (Milieu biphasique).
Dans la même salière deux embryons se sont développés normalement, le troisième est envahi par des vésicules . G X2
- 2 - G X3
- 3 - Embryon mis en culture au stade 9 somites (Milieu biphasique).
L'opacification est légère.
- 4 - Embryon mis en culture au stade 9 somites (Milieu liquide).
La morphologie n'est pas conservée, l'embryon prend une forme sphérique.
- 5 - Embryon mis en culture au stade 12 somites (Milieu liquide).G X3
La morphologie est respectée, l'explant est devenu opaque.
- 6 - Embryon mis en culture au stade 7 somite (Milieu biphasique) G X2
La translucidité est bonne, la membrane amniotique (Ma) s'est reformée, le péricarde (Pe) a proliféré.
- 7 - Embryon mis en culture au stade 5 somites (Milieu biphasique) G X2
Le développement est très important, la translucidité bonne.
L'embryon a conservé sa flexion dorsale.
- 8 - Embryon mis en culture au stade 11 somites (Milieu biphasique) G X2
- 9 - Embryon mis en culture au stade 15 somites (Milieu biphasique).
L'organogénèse semble très bonne, on aperçoit, par translucidité le futur canal rachidien.

1 AB - premier arc branchial

Co - coeur

Ma - Membrane amniotique

Mes - mésencéphale

Pc - péricarde

St - Stomodeum

Vop - Vésicule optique

Vot - vésicule optique

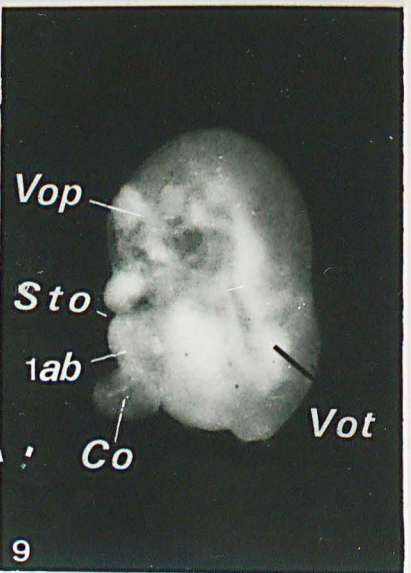
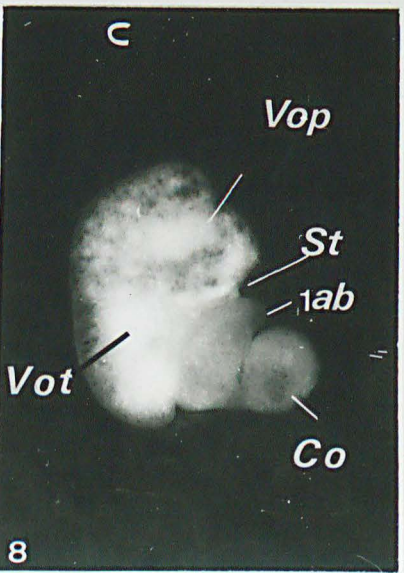
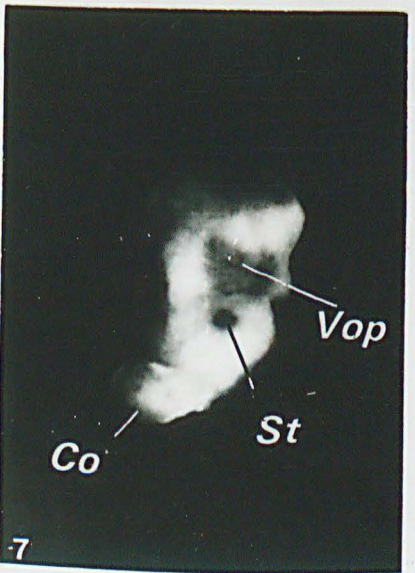
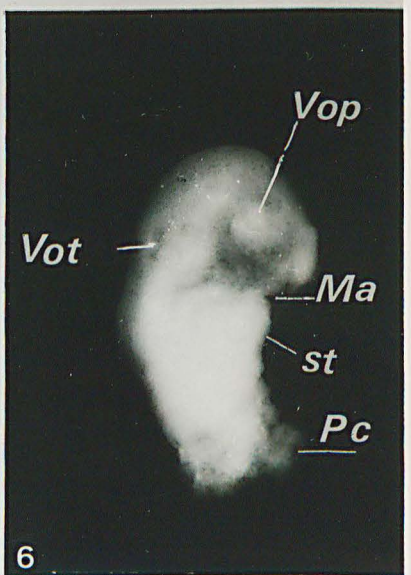
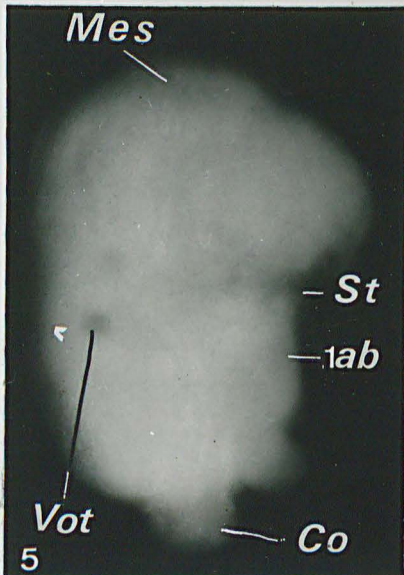
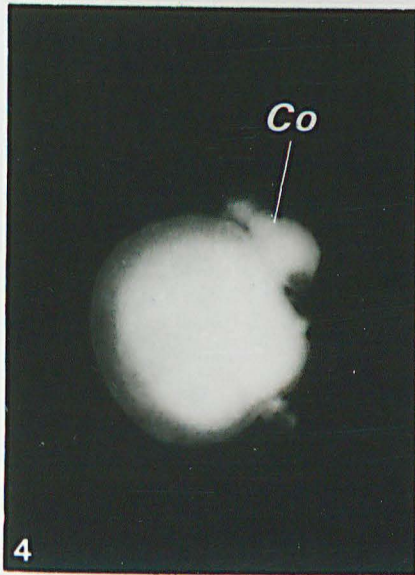
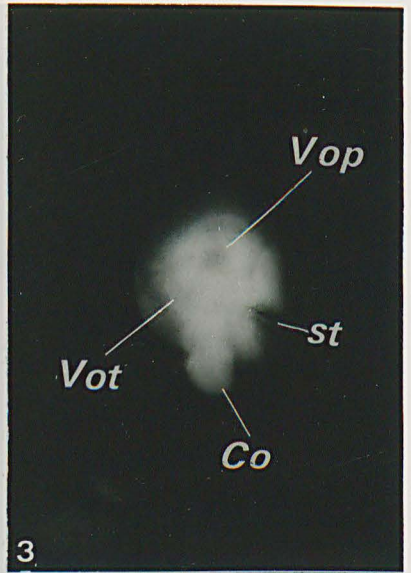
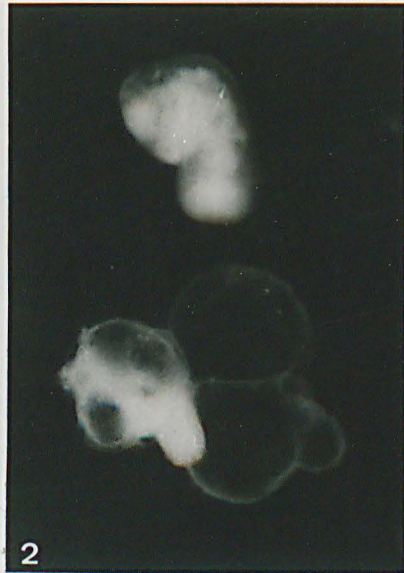


PLANCHE II

Embryons cultivés durant 7 jours en milieu biphasique.

1,2,3,4 - Embryon mis en culture au stade 12 somites :

L'organogenèse est avancée; la vésicule optique montre le développement du canal endolymphatique, ce qui correspond à un développement normal de 40 somites pour cet organe.

L'ébauche cardiaque, quoique contractile, est inorganisée.

Le tissu nerveux, lui, semble bien organisé.

Le premier arc branchial a subi un retard d'évolution.

5,6,7,8 - Embryon mis en culture au stade 4 somites:

La vésicule optique a suivi un développement presque normal, nous n'avons pas noté la formation du cristallin.

La vésicule optique montre le prolongement du canal endolymphatique et le début de la saccule (ébauche de la cochlée)

Le stomodeum est bien dessiné.

On note la présence d'une vésicule dans l'ébauche cardiaque.

Voir planche III-2.

9,10 - Embryon mis en culture au stade 7 somites.

Le développement des organes est presque normal, on remarque surtout l'apparition du bourgeon olfactif qui survient normalement vers 40 somites.

11,13 - Embryon mis en culture au stade 6 somites. L'organogenèse est moins avancée, mais l'aspect des cellules est excellent.

Voir planche III - 3).

12 - Embryon mis en culture au stade 13 somites. Le tissu nerveux a poursuivi une histogénèse presque normale (voir planche III-4).

14 - Détail de la figure 12 - épithélium stomodeal :

Ce - canal endolymphatique

E - encéphale

Ec - ébauche cardiaque

ep.Sto - épithélium stomodeal

Ia - Intestin antérieur

Sto - stomodeum

te - télencéphale

Vop - Vésicule optique

Vot - Vésicule otique

me ? (1/2 R)

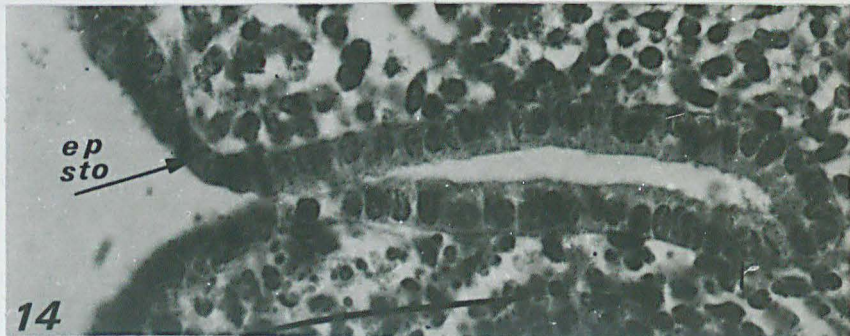
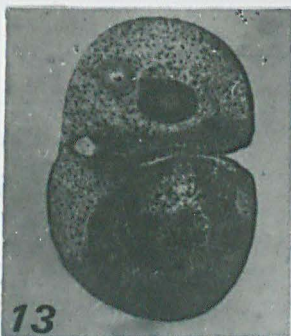
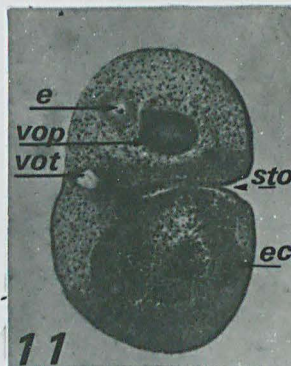
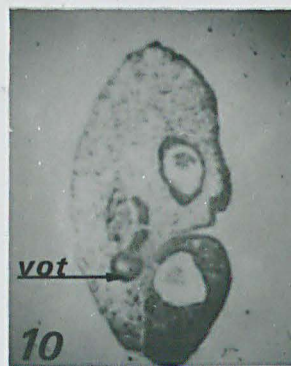
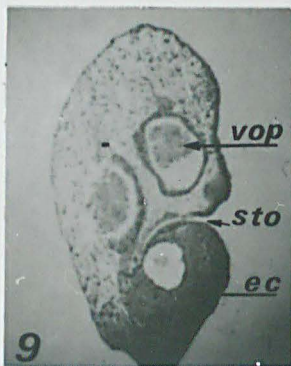
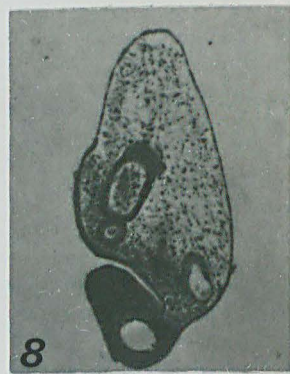
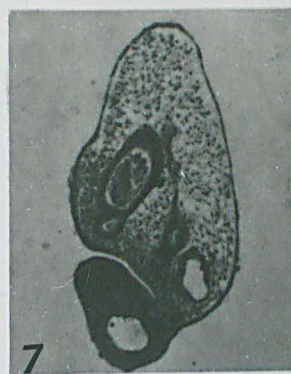
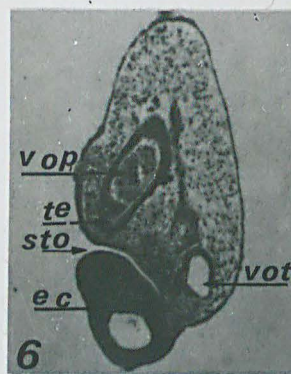
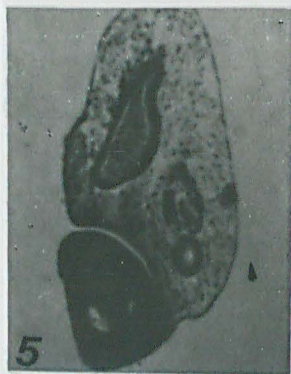
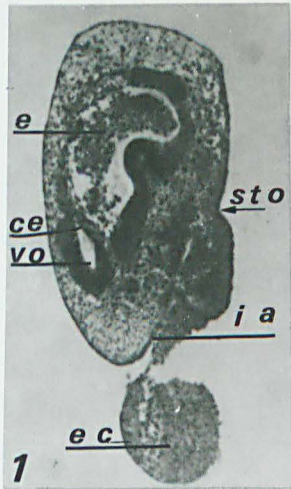


PLANCHE III

- 1 - Embryon témoin de 25 somites. La séparation entre le premier arc branchial et l'aire cardiaque est nette. Le péricarde est considérablement développé ainsi que les aortes. La vésicule optique n'est pas encore fermée.
- 2 - Détail de la figure 8 planche II.
- 3 - Détail de la figure 11 planche II.
- 4 - Détail de la figure 12 planche II. Noter l'aspect du tissu nerveux.

Ah - Aire hépatique
CeL - Canal endolymphatique
Ec - Ebauche cardiaque
Eh - Ebauche hépatique
I A - Intestin antérieur
MES - Mésencéphale
Pc - péricarde
Rh - Rhombencéphale
Sto - Stomodeum
TE - Télencéphale
TH - Placode thyroïdienne
TN - Tissu nerveux
Vop - Vésicule optique
Vot - Vésicule optique

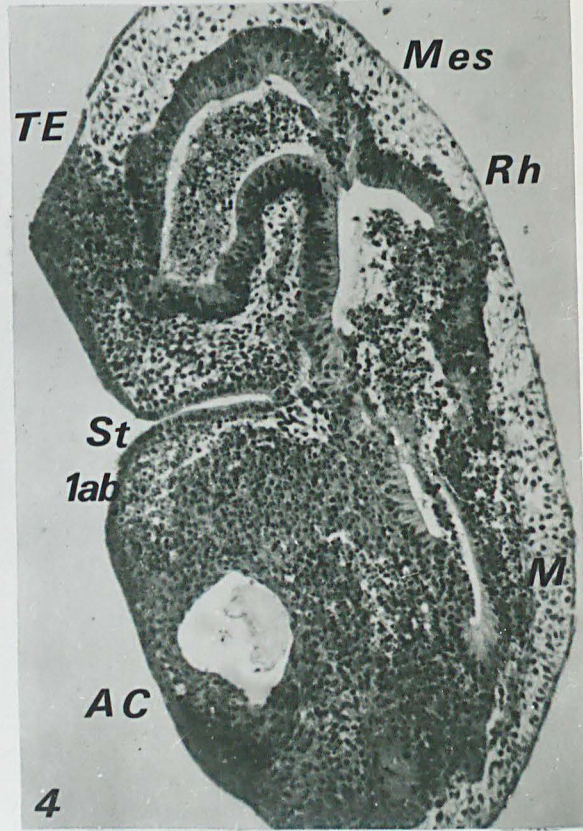
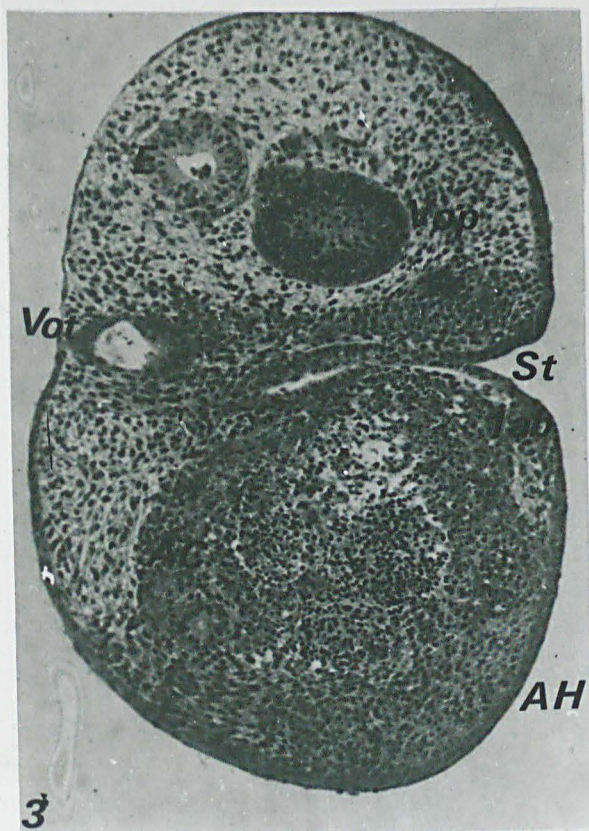
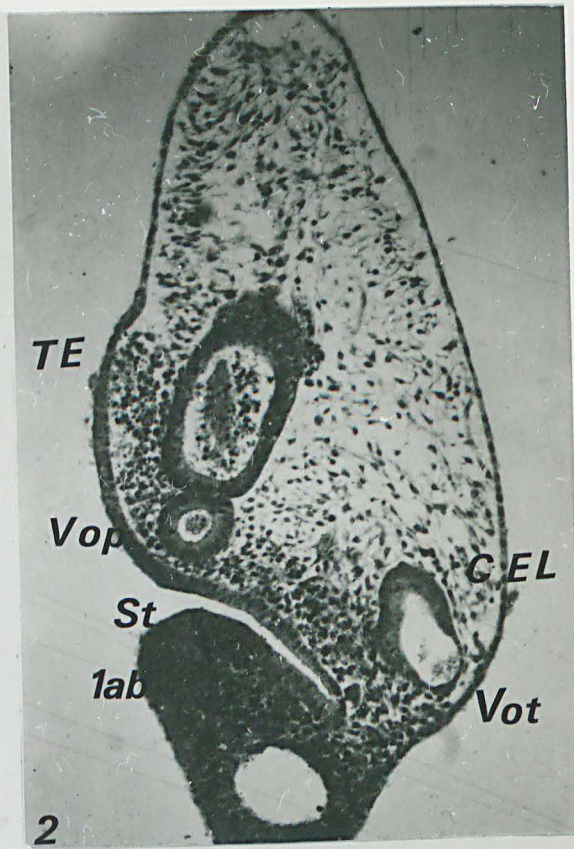
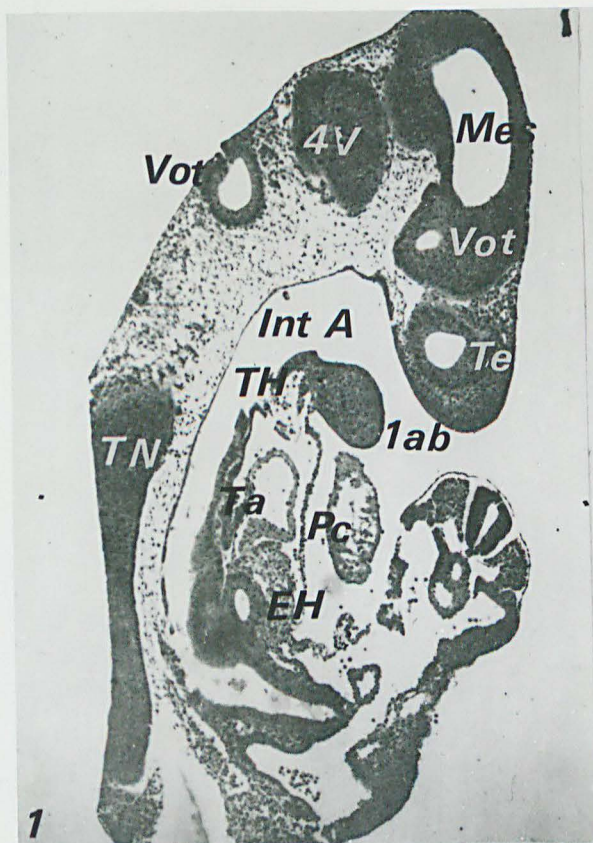


PLANCHE IV

1 - Embryon cultivé 7 jours au stade 6 somites.

2 - Embryon cultivé 7 jours au stade 4 somites (*in toto*)

La partie postérieure qui ne s'est pas développée est occupée par une grosse vésicule, cela n'a pas nui au développement du péricarde et surtout de la partie céphalique.

3 - Embryon cultivé sept jours au stade 4 somites.

4 - Embryon cultivé sept jours au stade présomitique

Une vésicule envahit la partie caudale.

Noter la présence de l'ébauche cardiaque contractile.

1 AB - premier arc branchial.

Die - Diencéphale

EC - ébauche cardiaque

LD - lame dentaire

Mes - mésencéphale

Olf - placode olfactive

Pe - proencéphale

Per - péricarde

Rh - Rhombencéphale

St - Stomodeum

Tel - Télencéphale

Vop - Vésicule optique

Vot - Vésicule otique

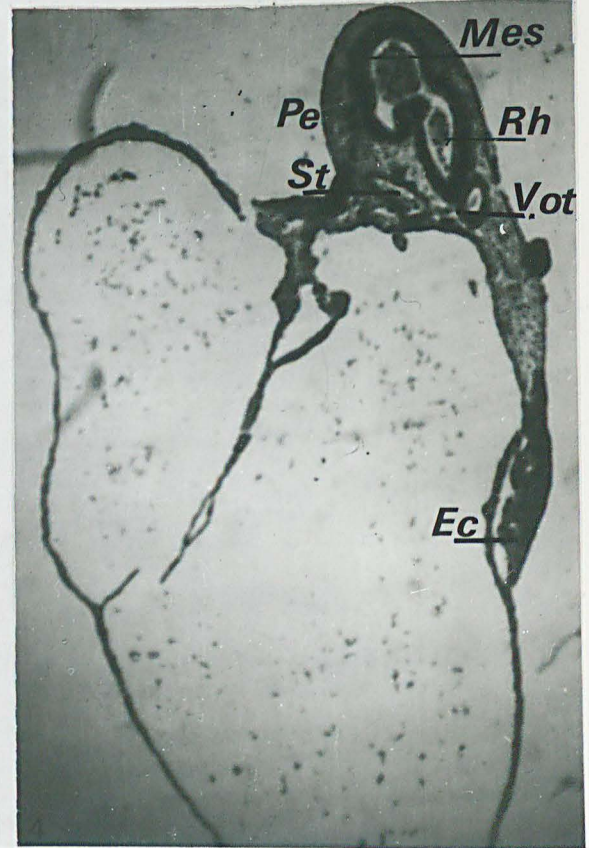
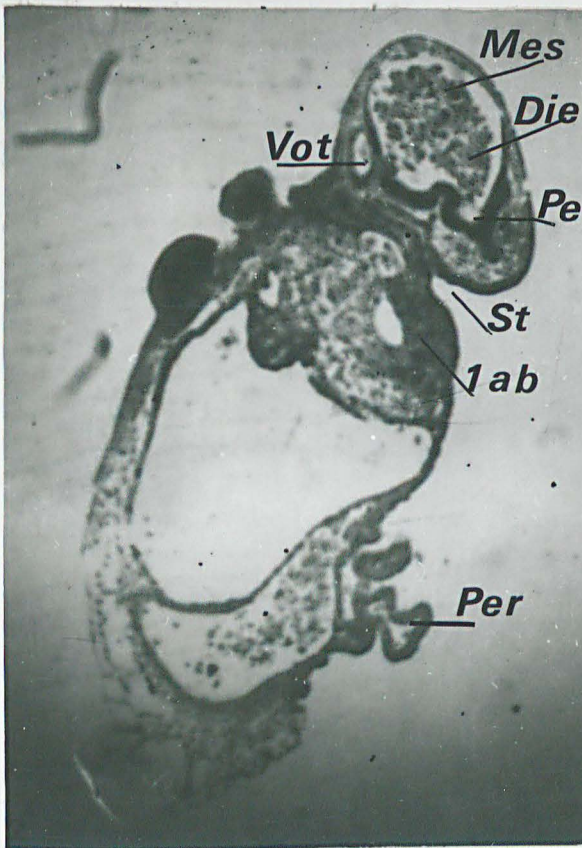
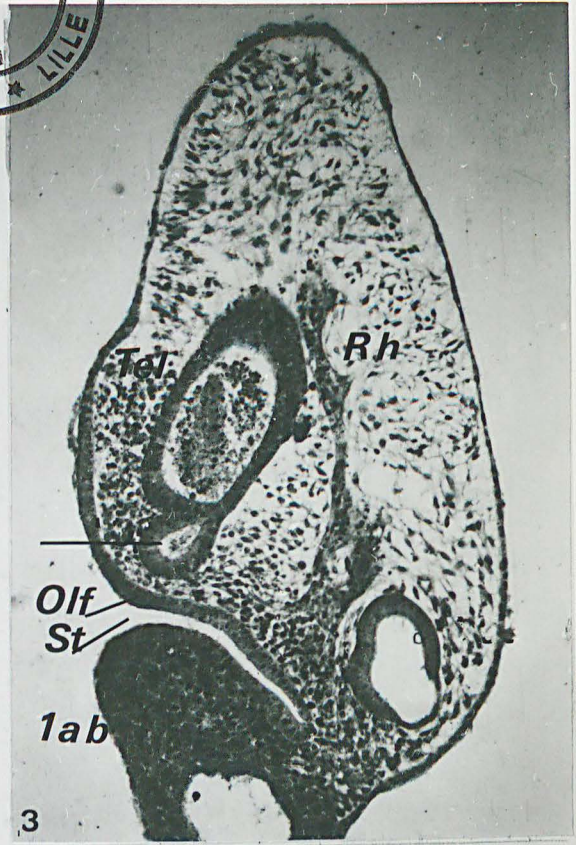
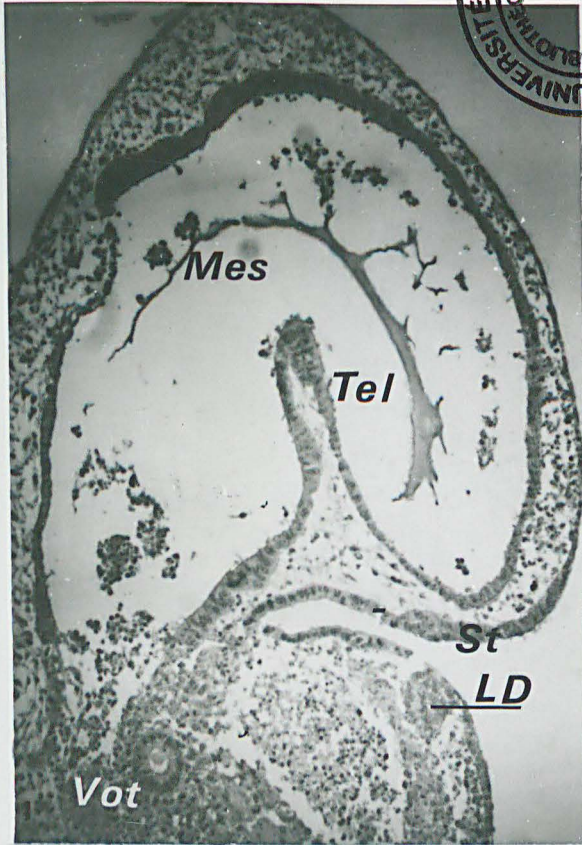
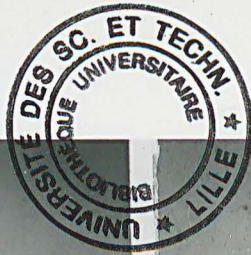


PLANCHE V

1, 2, 3, 4 - Embryon cultivé 7 jours au stade 13 somites
Formation de l'ébauche de l'Hypophyse

1 AB - premier arc branchial

EH - ébauche hypophysaire

Est - épaissement de l'épithélium stomodeal.

MES - mésencéphale

PE - proencéphale

Sto - stomodeum

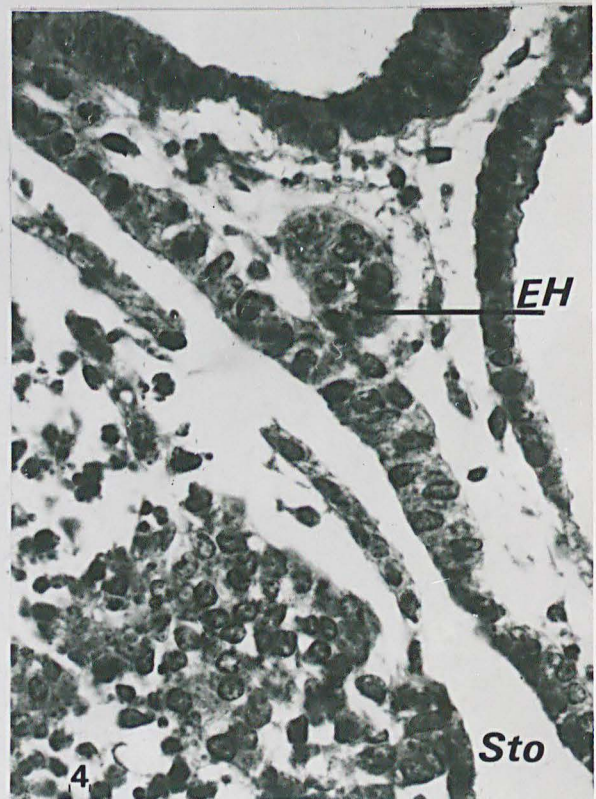
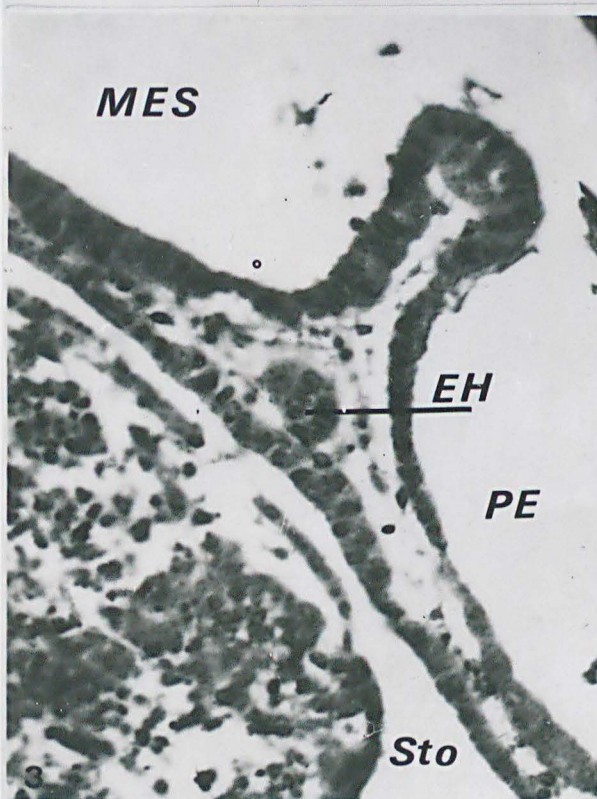
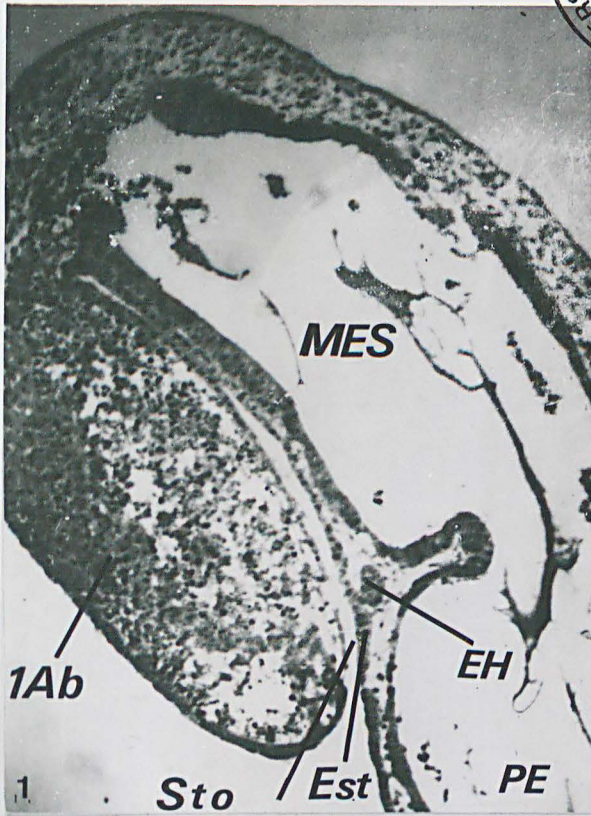
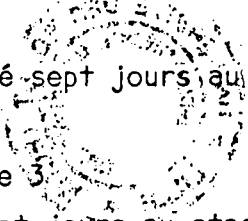


PLANCHE VI

- 
- 1,2,3 - Embryon cultivé sept jours au stade 12 somites
coupe frontale.
 - 4 - Détail de la figure 3
 - 5 - Embryon cultivé sept jours au stade 9 somites.
 - 6 - Détail de la figure 5 : ébauche cardiaque.
 - 7 - Détail de la figure 5 : placode olfactive
 - 8 - Détail de la figure 5 : Intestin antérieur et Rhombencéphale
 - 9 - Embryon du stade 9 somites, ayant formé une ébauche du
cristallin.
 - 10 - Ebauche olfactive (embryon du stade 4 somites).

CR - cristallin

EC - ébauche cardiaque

EH - ébauche hépatique

IA - Intestin antérieur

olf - placode olfactive

PE - proencéphale

Rh - Rhombencéphale

Sto - stomodéum

TE - télencéphale

VOP - vésicule optique

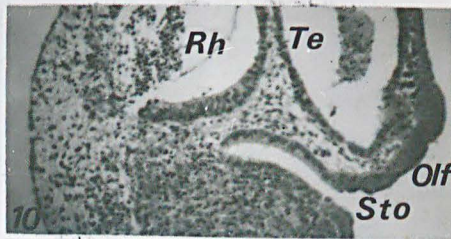
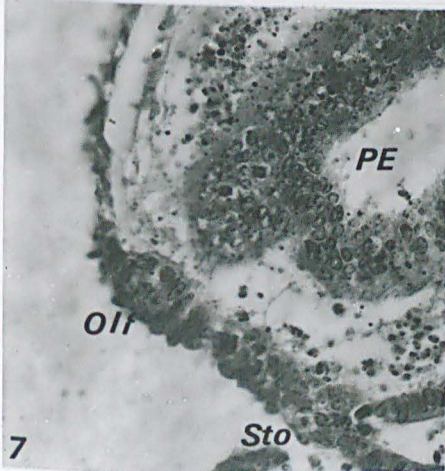
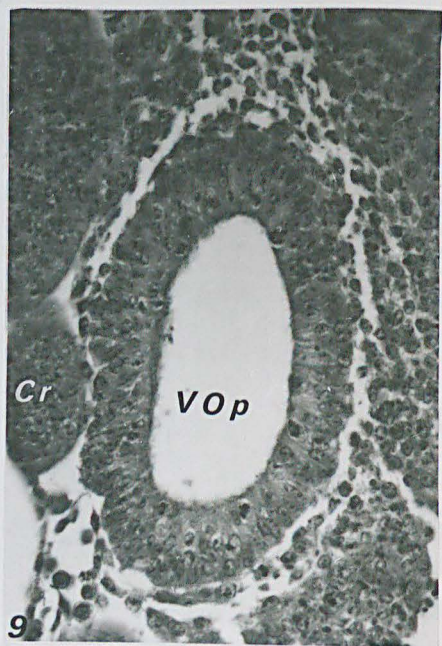
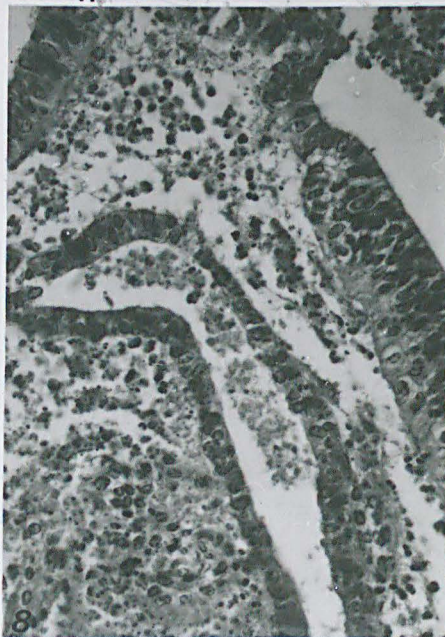
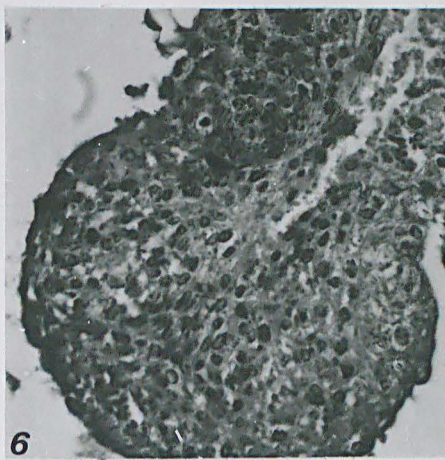
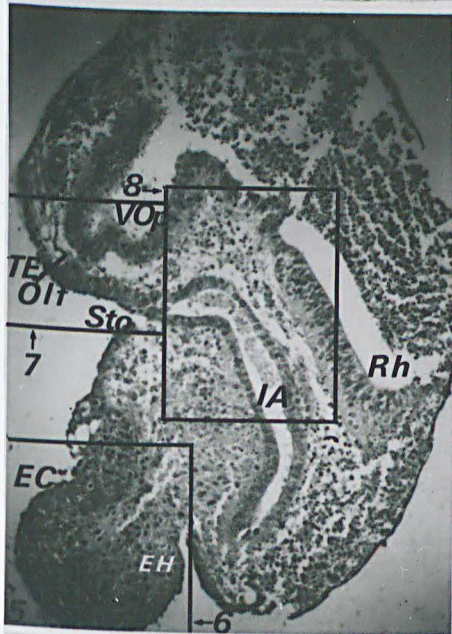
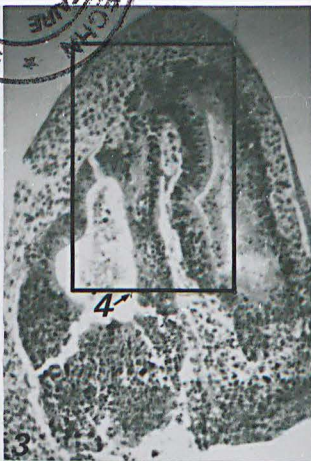
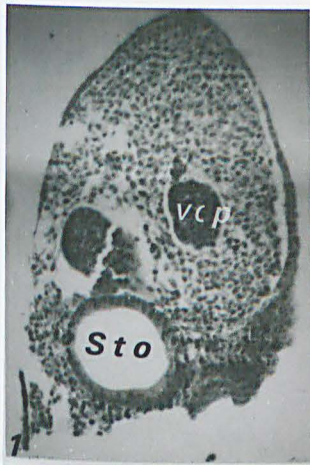


PLANCHE VIII

1,2,3,4 - Deux ébauches optiques prélevées sur un embryon
de 14 somites et cultivées 7 jours.

Formation de la rétine et du cristallin.

Ahy - artère hyaloïdienne

Cr - cristallin

E - encéphale

EC - ébauche cristallinienne

EO - ébauche optique

ER - espace rétinien

FE - feuillet externe

FI - feuillet interne

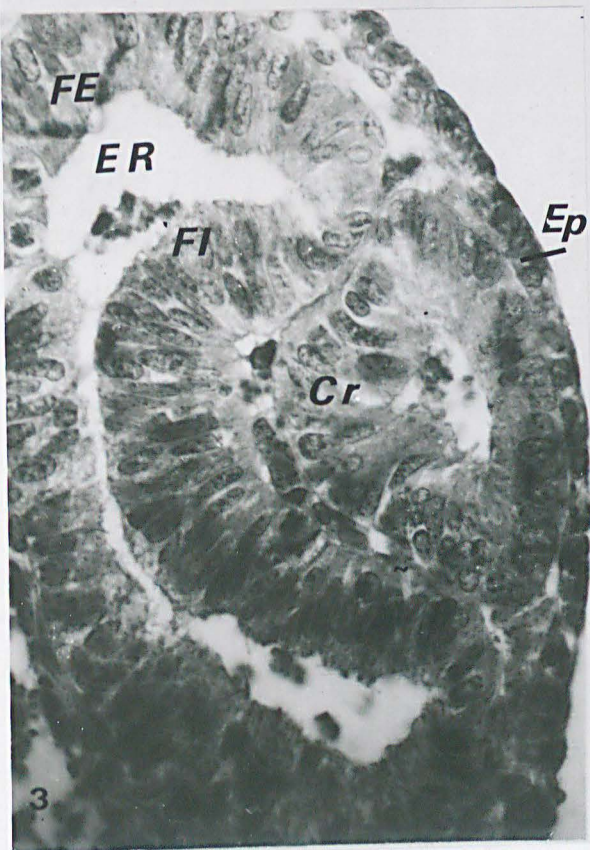
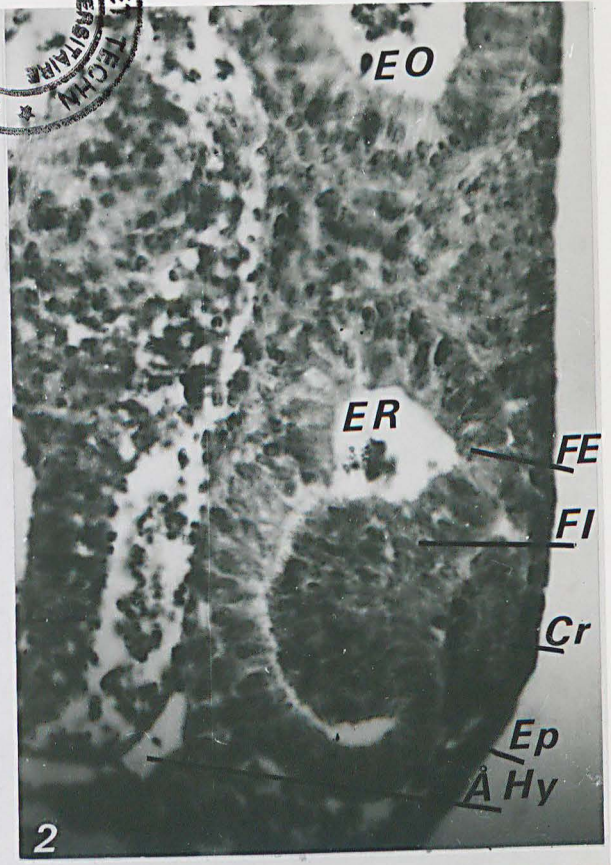
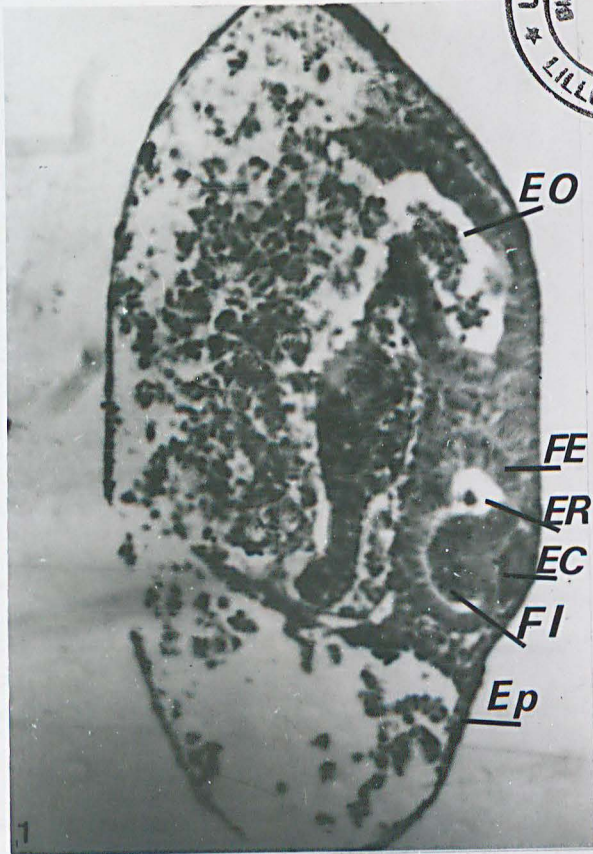
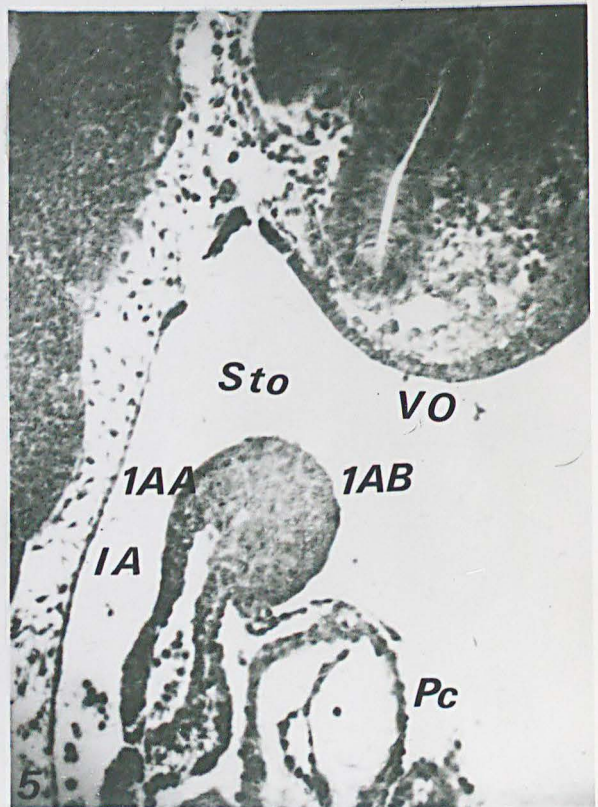
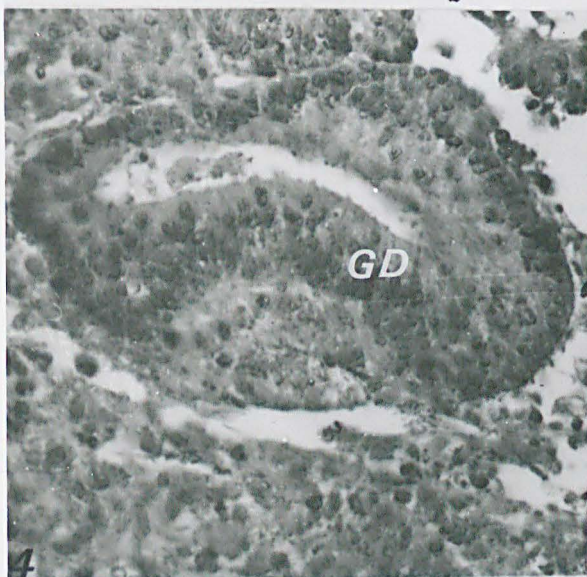
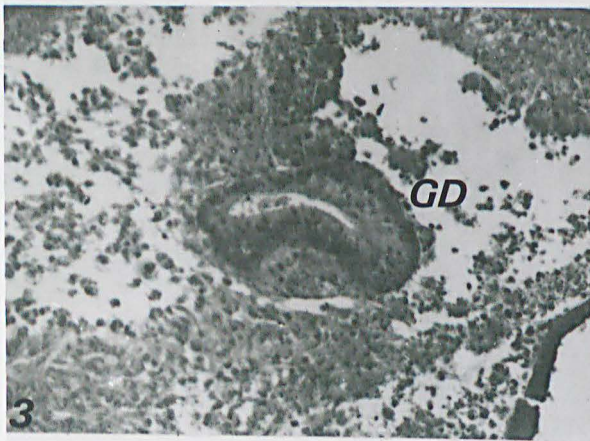
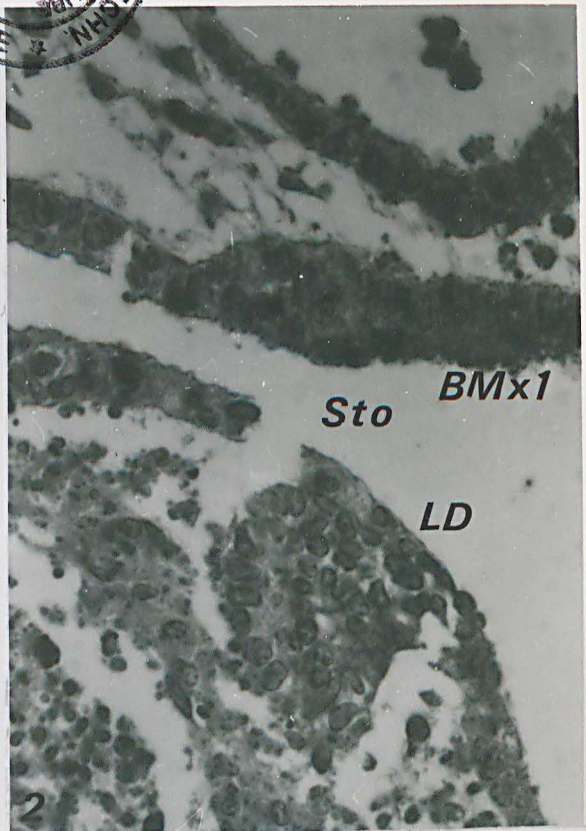
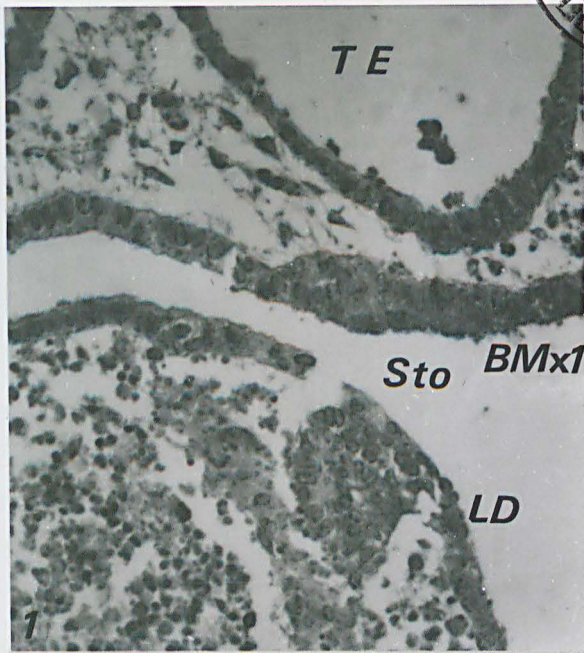


PLANCHE IX

- 1, 2 - Embryon de 15 somites cultivé sept jours.
épaississement de l'épithélium stomodéal M x 1.
Formation de la lame dentaire sur le 1er arc branchial.
- 3, 4 - Bourgeons dentaires obtenus après 7 jours de culture
d'arc branchiaux de 13 somites.
- 5 - Témoin 13 somites.
Le premier arc branchial est formé d'une masse de cellules
non différenciées.

- 1 AA - premier arc aortique
- 1 AB - premier arc branchial
- BMx1 - Bourgeon maxillaire supérieur
- PC - péricarde
- GD - germe dentaire
- LD - lame dentaire
- Sto - stomodeum
- TE - Télencéphale
- VO - vésicule optique





1, 2, 3 - Germes dentaires obtenus après sept jours de culture
d'un arc branchial de 20 somites.

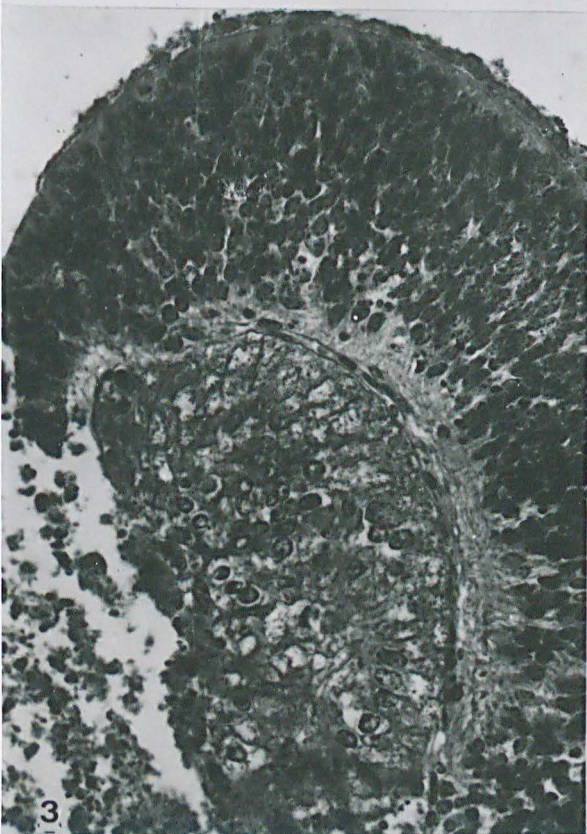
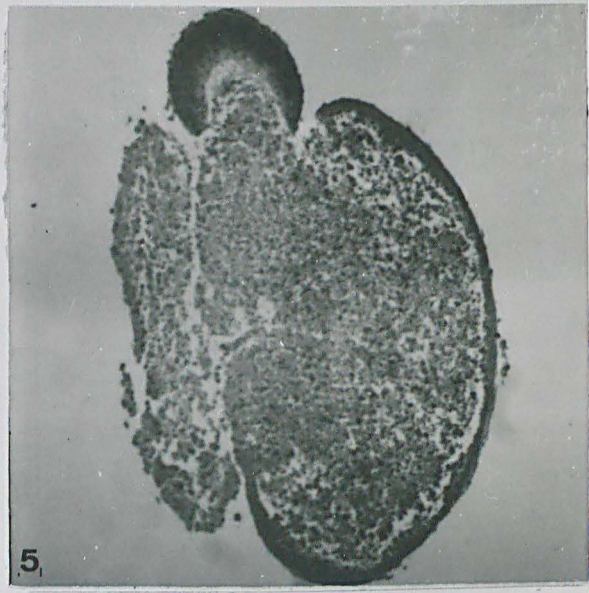
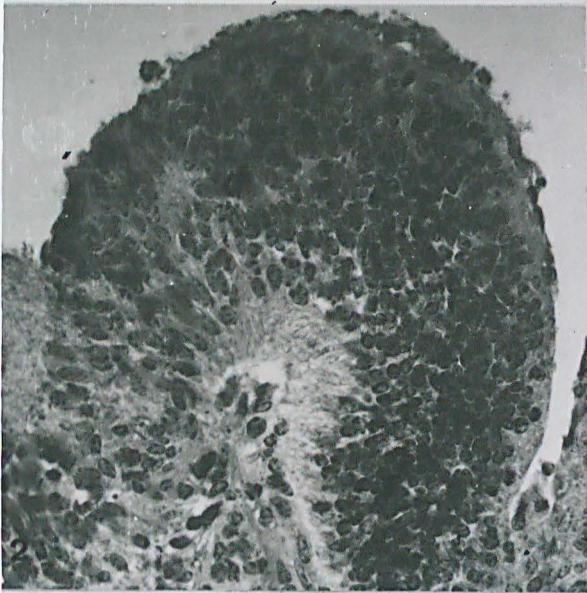
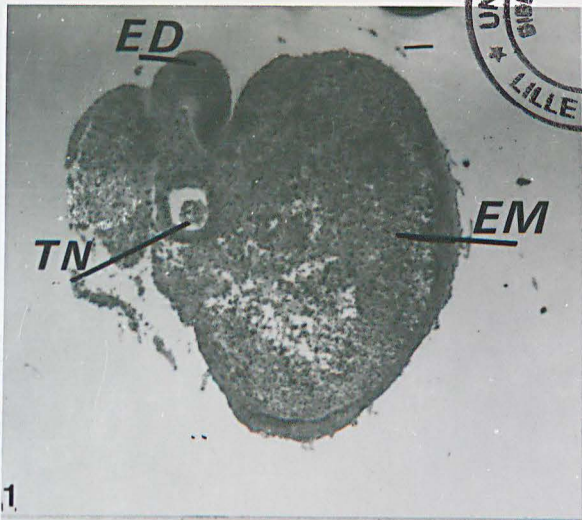
4, 5, 6 - germes dentaires obtenus après sept jours de culture
d'un arc branchial de 24 somites.

GD - germe dentaire

LD - lame dentaire

MX - arc mandibulaire

TN - tissu nerveux





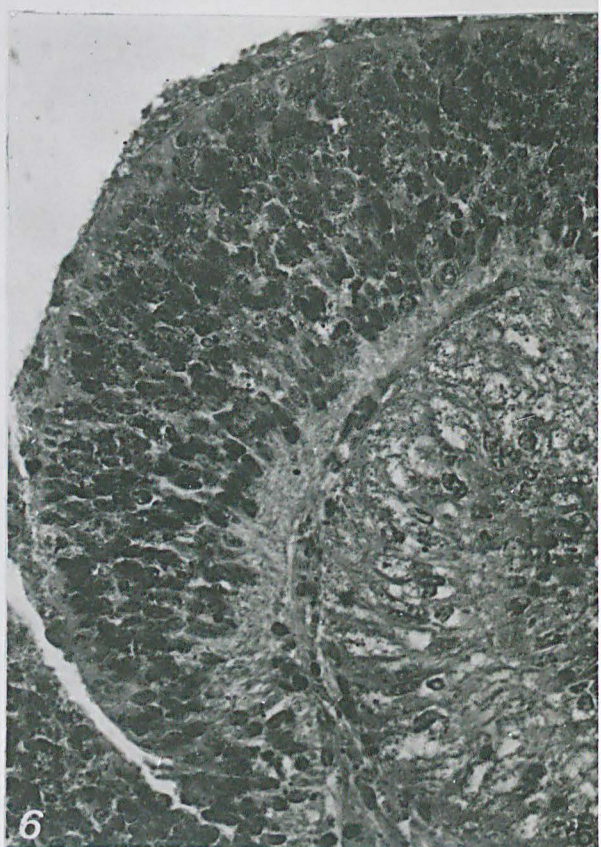
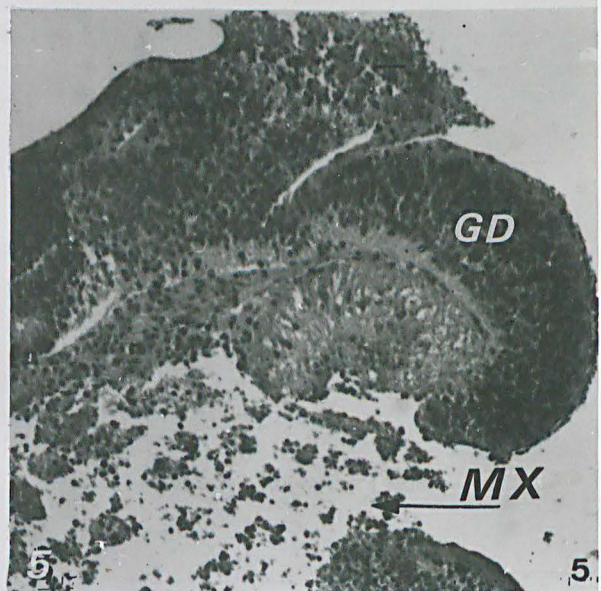
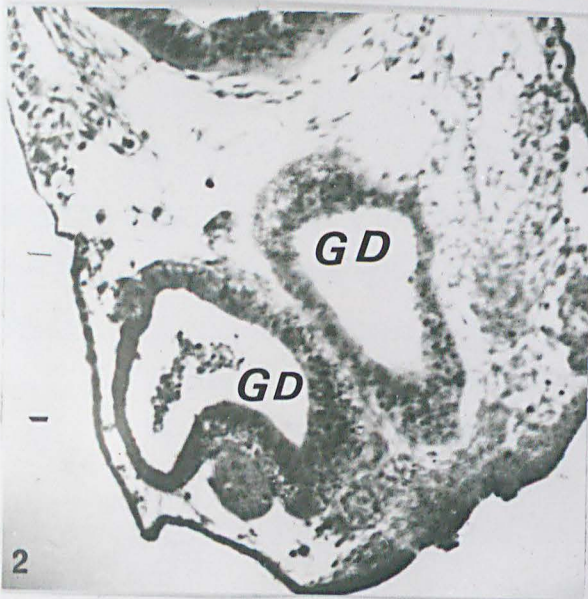
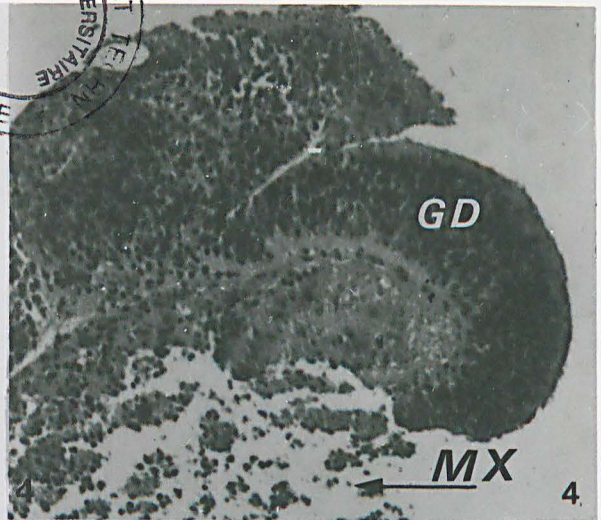
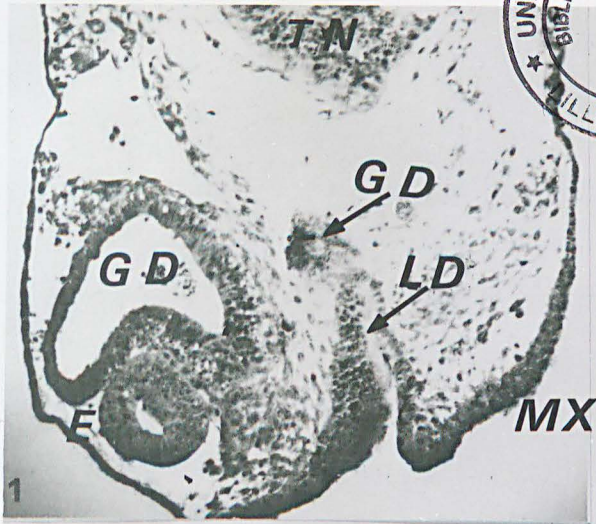
1, 2, 3 - Germes dentaires obtenus à partir d'ébauches mandibulaires
d'embryons au stade de 35 somites.

4, 5, 6 - même expérimentation stade 30 somites.

ED - ébauche dentaire

EM - ébauche mandibulaire.

TN - tissu nerveux



BIBLIOGRAPHIE

- BENOIT S., 1969 - Irradiations localisées *in vitro* de gastrulas de Souris. C.R. Acad. Sci., 268, pp. 371-374.
- BIGGERS J.D., WHITTEN W.K., WHITTINGHAM., 1971 - The culture of mouse embryos *in vitro*. In : Methods in mammalian embryology. San Francisco : Freeman, Daniel J.C.Jr, pp. 86-116.
- BRACHET A., 1913 - Recherche sur le déterminisme héréditaire de l'oeuf des Mammifères. Développement *in vitro* de jeunes vésicules blastodermiques du lapin. Arch. Biol. Paris, 28, pp. 447-503.
- BRACHET A., 1912 - Développement *in vitro* de blastodermes et de jeunes embryons de Mammifères. C. R. Acad. Sci. Paris, 155, pp. 1191-1193.
- BRINSTER R.L., 1963 - A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. Exp. Cell Res., 32, pp. 205-208.
- BRINSTER R.L., 1965 - Studies on the development of mouse embryos *in vitro*.
 I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration.
 II. The effect of energy source.
 III. The effect of fixed-nitrogen source.
J. exp. Zool., 158, I : pp. 49-58, II : pp. 59-68, III : pp. 69-78.
- BRINSTER R.L., 1967 - Protein content of the mouse embryo during the first five days of development. J. Reprod. Fert., 27, pp. 329-338.
- CARREL A., 1913 - Artificial activation of the growth *in vitro* of connective tissue. J. Exp. Med., 17, p. 14.
- CHANG M.C., 1949 - Effects of heterologous sera on rabbit ova. J. gen. Physiol., 32, pp. 291-300.
- CHANG M.C., 1959 - Fertilization of rabbit ova *in vitro*. Nature, 184, p. 466.
- CHEN J.M., 1954 - The cultivation in fluid medium of organized liver pancreas and others tissues of foetal rats. Exp. Cell Res., 7, p. 518.
- CLARKSON S.G., DOERING J.V., RUNNER M.N., 1969 - Growth of post-implantation mouse embryos cultured in a serum-supplemented, chemically defined medium. Teratology, 2, pp. 181-186.
- COLE R., PAUL S., 1965 - Properties of cultural preimplantation mouse and rabbit embryos, and cell strain derived from them. Ciba foundation. Symposium on preimplantation stages of pregnancy. Ed. G. Wolstenholme and M. O' Connor J. and A. Churchill Ltd London, pp. 82-112.

- EAGLE H., 1959 - Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, 130, p. 432.
- EARLE W.R., 1934 - A technique for the adjustment of oxygen and carbon dioxide tensions, and hydrogen ion concentration, in tissue culture planted in Carrel flasks. Arch. exp. Z., 16, p. 116.
- GEY, d'après PAUL J., 1965 - in : Cell and Tissue Culture p. 83, Third Edition. E. and S. Livingstone Ltd, Edimburg and London.
- GRAY C., DAVIDSON R.G., COHEN M.M., 1971 - A simplified technique for the culture of amniotic fluid cells. J. Pediat., 79, pp. 119-121.
- GUNBERG D.L., 1976 - *In vitro* development of postimplantation Rat embryos cultured on dialized rat serum. Teratology, 14, pp. 65-69.
- HAMMOND J. Jr, 1949 - Recovery and culture of Tubal mouse ova. Nature, 163, pp. 28-29.
- HANKS J.H., WALLACE R.E., 1949 - Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 71, pp. 196-200.
- HARRIS J.J., 1958 - The human tumor grown in the egg. Ann. N.Y. Acad. Sci., 76 p. 764.
- HARRIS M., 1959 - Selective uptake and release of substances by cells. In : Symposium on the chemical basis of Development. Ed. W.J. McElroy, B. Glass Maryland : Johns Hopkins Press.
- HEALY G., FISHER D., PARKER R.C., 1954 - Nutrition of animal cells in Tissue culture. IX Synthetic medium n°703. Canad. J. Biochem., 32, p. 327.
- HEALY G., FISHER D., PARKER R.C., 1955 - Nutrition of animal cells. X. Synthetic medium n°858. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 89, p. 71.
- HSU Y.C., BASKAR J., STEVENS L.S., RASH J.E., 1974 - Development *in vitro* of mouse embryos from the two-cell egg stage to the early somite stage. J. Embryol. exp. Morph., 31, pp. 235-245.
- HSU Y.C., 1973 - Differentiation *in vitro* of mouse embryos to the stage of early somite. Devel. Biol., 33, pp. 403-411.
- HSU Y.C., 1972 - Differentiation *in vitro* of mouse embryos beyond the implantation stage. Nature, 239, pp. 200-202.

- JOLLY J., 1903 - Sur la durée de vie et la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme. C. R. Soc. Biol. (Paris), 55, p. 1266.
- JOLLY J., LIEURE C., 1938 - Recherches sur la culture des oeufs de Mammifères. Arch. Anat. Micr., 34, pp. 307-374.
- JOLLY J., LIEURE C., 1968 : in "La culture d'organes", p. 14, SIGOT M., Presses Universitaires de France, Paris.
- KARCHER-DJURICIC V., RUCH J.V., 1970 - Différenciation *in vitro* d'ébauches dentaires jeunes ou présomptives d'embryons de souris. C. R. Soc. Biol., 164, 6, pp. 1347-1350.
- KOCHHAR O.M., HOFFMAN D.B., 1974 - Growth and biosynthesis of cell components in mouse embryos cultured in rotating tubes. Teratology, 9, A 25-26 Abst.
- KREBS M.A., 1950 - Body size and tissue respiration. Biochim. Biophys. Acta, 4, p. 249.
- LE DOUARIN G., 1974 - Analyse expérimentale des premiers stades de développement cardiaque chez les Vertébrés supérieurs. Ann. Biol., XIII, 1-2, pp. 43-50.
- LEWIS W.H., WRIGHT E.S., 1935 - On the early development of the mouse egg. Contribution to embryology. Carnegie Inst. of Washington, 25, pp. 115. In : Whitten W.K., 1970.
- McLAREN, BIGGERS J.D., 1958 - Successful development and Birth of mice cultivated *in vitro* as early embryos. Nature, 182, pp. 877-888.
- MINTZ B., 1962 - Experimental study of the developing mammalian egg. Removal of the zona pellucida. Science, 138, pp. 594-595.
- MINTZ B., 1964 - Formation of genetically mosaic mouse embryos and early development of "lethal (t^{12}/t^{12})-normal" mosaics. J. exp. Zool., 157, pp. 273-292.
- MOORE G.E., GERNER R.E., FRANKLIN H.A., 1967 - Culture of normal human leucocytes. J.A.M.A., 119, p. 519.
- MULNARD J., 1964 - Obtention *in vitro* du développement continu de l'oeuf de souris du stade II au stade blastocyst. C. R. Acad. Sci., 258, pp. 6228-6229.
- MULNARD H., 1965 - Aspects cytochimiques de la régulation *in vitro* de l'oeuf de souris après destruction des blastomères de stade II. Bull. Acad. Roy. Med. Belg., 2ème Série 5, pp. 35-67.

- MULNARD J., 1968 - Les propriétés phagocytaires du Trophoblaste au cours de la première phase de l'ovo-implantation chez la souris. Arch. Biol. Liège, 78, pp. 575-594.
- NANOT J., LE DOUARIN G., 1971 a - Ultrastructure du tissu myocardique différencié en culture *in vitro* à partir du mésoderme précardiaque de l'embryon de souris. C. R. Soc. Biol., 165, pp. 405-407.
- NANOT J., LE DOUARIN G., 1971 b - Aspects ultrastructuraux du myocarde de l'embryon de souris et de la différenciation *in vitro* du mésoderme précardiaque. Bull. Ass. Anat., 152, pp. 620-626.
- NEW D.A.T., 1966 - The culture of vertebrate embryos. Academic Press, III fith Avenue, New York.
- NEW D.A.T., 1966 - Development of rat embryos cultured in blood sera. J. Reprod. Fert., 12, pp. 509-524.
- NEW D.A.T., 1970 - Culture of fetuses *in vitro*. Adv. in Biosc., 6, pp. 367-379.
- NEW D.A.T., 1971 - Methods for the culture of post-implantation embryos of rodents. In : Methods in mammalian embryology. J.C. Daniel Jr Ed. Freeman, San Francisco, pp. 305-319.
- NICHOLAS J.S., RUDNICK D., 1934 - The development of rat embryos in tissue culture. Proc. Nat. Acad. Sci., 20, pp. 656-658.
- NICHOLAS J.S., RUDNICK D., 1938 - Development of rat embryos of egg-cylinder to head-fold stages in plasma cultures. J. exp. Zool., 78, pp. 205-232.
- PAUL J., 1965 - Cell and Tissue culture. E., S., Livingstone Ltd, Edimburg and London.
- RINALDI L.M., 1959 - An improved method for the isolation and quantitative cultivation of embryonic cells. Exp. Cell Res., 16, pp. 477-505.
- RUNNER M.N., PALM J., 1953 - Transplantation and survival of infertilized ova of the mouse in relation to post-ovulatory age. J. exp. Zool., 124, pp. 303-316.
- TAMARIN A., JONES K.W., 1968 - A circulating medium system permitting manipulation during culture of post-implantation embryos. Acta Embryol. Morphol. Exp., pp. 288-301.
- TAROWSKI A.K., 1961 - Mouse chimeras developed from fused eggs. Nature, 190, pp. 857-860.
- TARKOWSKI A.K., 1964, - Patterns of pigmentation in experimentally produced mouse chimaerae. J. Embryol. exp. Morph., 12, pp. 575-585.

- THEILER A.K., 1964 - The House mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Nex York.
- THIEDE H.A., CREASMAN W.T., METCALFE S., 1966 - Antenatal analysis of human chromosomes. Amer. J. obstet. Gynec., 99, p. 796.
- TROWELL O.A., 1954 - A modified technique for organ culture *in vitro*. Exp. Cell Res., 6, p. 246.
- TYRODE M.V., 1910 - The mode of action of some purgative salts. Arch. Int. Pharmacodyn., 20, p. 205.
- WADDINGTON C.J., WATERMAN A.J., 1933 - The development *in vitro* of young rabbit embryos. J. Anat., 67, pp. 355-370.
- WAYMOUTH C., 1959 - Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929 (strain L) mouse cell in a simple chemically defined medium (MB 752/1). J. Nation. Canc. Inst., 22, pp; 1003-1005.
- WHITTEN W.K., 1970 - Effect of oxygen on cleavage of mouse eggs *in vitro*. Society for study of reprod. 2nd Ann. Meeting, Davis, Calif. Biol. Reprod., Abs 28. In : Whitten W.K., 1970.
- WHITTEN W.K., BIGGERS J.D., 1968 - Complete development *in vitro* of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. J. Reprod. Fertil., 17, p. 399.
- WHITTEN W.I., 1956 - Culture of tubal mouse ova. Nature, 177, p. 96.
- WHITTEN W.K., 1957 a - Culture of tubal ova. Nature, 179, pp. 1081-1082.
- WHITTEN W.K., 1957 b - The effect of progesterone on the development of mouse eggs *in vitro*. J. Endocrinol., 16, pp. 80-85.
- WITSCHI E., 1962 - Development Rat. In : Growth. VII. Pre-natal vertebrate development. Biological handbooks of the federation of american societies for experimental biology. Altman and Dittmer, Washington.
- WOLF E., 1965 - Principes généraux de la culture organotypique *in vitro*. In : Les cultures organotypiques. Exposés actuels de biologie cellulaire. Thomas J.A., Ed. Masson et Cie, Paris, pp. 1-13.

