

50376
1987
119

50376
1987
119

N° d'ordre 730

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS

**THESE DE DOCTORAT D'ETAT
EN SCIENCES NATURELLES**

Présentée par :
Jean-Pierre MAUFROID



**ETUDE DES INTERACTIONS CELLULAIRES IMPLIQUEES DANS LA
DETERMINATION ET LA DIFFERENCIATION DES CELLULES
GERMINALES ET DU MESODERME CHEZ PLEURODELES WATTLII
(AMPHIBIEN URODELE)**

Soutenue le 30 juin 1987 devant le jury :

Président : M. A. BART
Rapporteurs : MM. C. HOUILLON - J.D. GIPOULOUX
M. A. CAPURON (Directeur de Thèse)
Examineur : M. P.D. NIEUWKOOP

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER,
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF,
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL,
PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI, Mes BEAUJEU, LELONG.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON, J. CORTOIS.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

M. A. DUBRULLE.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène
M. FOURET René
M. GABILLARD Robert
M. MONTREUIL Jean
M. PARREAU Michel
M. TRIDOT Gabriel

Electronique
Physique du solide
Electronique
Biochimie
Analyse
Chimie appliquée

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Génie des procédés et réactions chimiques
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERTRAND Hugues	Sciences Economiques et Sociales
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIS Pierre	Mécanique
M. BOISSIER Daniel	Génie civil
M. BOIVIN Jean Claude	Spectrochimie
M. BOUQUELET Stéphane	Biologie appliquée aux enzymes
M. BOUQUIN Henri	Gestion
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CATTEAU Jean pierre	Chimie organique
M. CAYATTE Jean Louis	Sciences Economiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. CHARET Pierre	Biochimie structurale
M. CHIVE Maurice	Composants électroniques optiques
M. COMYN Gérard	Informatique théorique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
M. CORIAT Benjamin	Sciences Economiques et Sociales
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Tectonique Géodynamique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DECAUQUE Pierre	Electronique
M. DEJAEGER Roger	Electrochimie et Cinétique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences Economiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DHAMELIN COURT Paul	Chimie physique
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBERULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides

M. DUPONT Christophe
 Mme EVRARD Micheline
 M. FAKIR Sabah
 M. FAUQUEMBERGUE Renaud
 M. FONTAINE Hubert
 M. FOUQUART Yves
 M. FOURNET Bernard
 M. GAMBLIN André
 M. GLORIEUX Pierre
 M. GOBLOT Rémi
 M. GOSSELIN Gabriel
 M. GOUDMAND Pierre
 M. GOURIEROUX Christian
 M. GREGORY Pierre
 M. GREMY Jean Paul
 M. GREVET Patrice
 N. GRIMBLOT Jean
 M. GUILBAULT Pierre
 M. HENRY Jean Pierre
 M. HERMAN Maurice
 M. HOUDART René
 M. JACOB Gérard
 M. JACOB Pierre
 M. JEAN Raymond
 M. JOFFRE Patrick
 M. JOURNAL Gérard
 M. KREMBEL Jean
 M. LANCRAND Claude
 M. LATTEUX Michel
 Mme LECLERCQ Ginette
 M. LEFEBVRE Jacques
 M. LEFEBVRE Christian
 Mlle LEGRAND Denise
 Mlle LEGRAND Solange
 M. LEGRAND Pierre
 Mme LEHMANN Josiane
 M. LEMAIRE Jean
 M. LE MAROIS Henri
 M. LEROY Yves
 M. LESENNE Jacques
 M. LHENAFF René
 M. LOCQUENEUX Robert
 M. LOSFELD Joseph
 M. LOUAGE Francis
 M. MAHIEU Jean Marie
 M. MAIZIERES Christian
 M. MAURISSON Patrick
 M. NESMACQUE Gérard
 M. MESSELYN Jean
 M. MONTEL Marc
 M. MORCELLET Michel
 M. MORTREUX André
 Mme MOUNIER Yvonne
 M. NICOLE Jacques
 M. NOTELET Francis
 M. PARSY Fernand
 M. PECQUE Marcel
 M. PERROT Pierre

Vie de la firme (I.A.E.)
 Génie des procédés et réactions chimiques
 Algèbre
 Composants électroniques
 Dynamique des cristaux
 Optique atmosphérique
 Biochimie structurale
 Géographie urbaine, industrielle et démographie
 Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
 Algèbre
 Sociologie
 Chimie physique
 Probabilités et statistiques
 I.A.E.
 Sociologie
 Sciences Economiques
 Chimie organique
 Physiologie animale
 Génie mécanique
 Physique spatiale
 Physique atomique
 Informatique
 Probabilités et statistiques
 Biologie des populations végétales
 Vie de la firme (I.A.E.)
 Spectroscopie hertzienne
 Biochimie
 Probabilités et statistiques
 Informatique
 Catalyse
 Physique
 Pétrologie
 Algèbre
 Algèbre
 Chimie
 Analyse
 Spectroscopie hertzienne
 Vie de la firme (I.A.E.)
 Composants électroniques
 Systèmes électroniques
 Géographie
 Physique théorique
 Informatique
 Electronique
 Optique - Physique atomique
 Automatique
 Sciences Economiques et Sociales
 Génie Mécanique
 Physique atomique et moléculaire
 Physique du solide
 Chimie organique
 Chimie organique
 Physiologie des structures contractiles
 Spectrochimie
 Systèmes électroniques
 Mécanique
 Chimie organique
 Chimie appliquée

M. PERTUZON Emile
M. PONSOLLE Louis
M. PORCHET Maurice
M. POSTAIRE Jack
M. POVY Lucien
M. RICHARD Alain
M. RIETSCH François
M. ROBINET Jean Claude
M. ROGALSKI Marc
M. ROY Jean Claude
Mme SCHWARZBACH Yvette
M. SLIWA Henri
M. SOMME Jean
M. STAROSWIECKI Marcel
M. STERBOUL François
M. TAILLIEZ Roger
M. THERY Pierre
M. THIEBAULT François
M. THUMERELLE Pierre
Mme TJOTTA Jacqueline
M. TOURSEL Bernard
M. TREANTON Jean René
M. TURREL Georges
M. VANDORPE Bernard
M. VASSEUR Christian
M. VAST Pierre
M. VERBERT André
M. VERNET Philippe
M. WACRENIER Jean Marie
M. WALLART Francis
M. WARTEL Michel
M. WATERLOT Michel
M. WEINSTEIN Olivier
M. WERNER Georges
M. WOZNIAK Michel
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Physiologie animale
Chimie physique
Biologie animale
Informatique industrielle
Automatique
Biologie animale
Physique des polymères
EUDIL
Analyse
Psychophysiologie
Géométrie
Chimie organique
Géographie
Informatique
Informatique
Génie alimentaire
Systèmes électroniques
Sciences de la terre
Démographie - Géographie Humaine
Mathématiques
Informatique
Sociologie du Travail
Spectrochimie infrarouge et Raman
Chimie minérale
Automatique
Chimie inorganique
Biochimie
Génétique
Electronique
Spectrochimie infrarouge et Raman
Chimie inorganique
Géologie générale
Analyse économique de la recherche et développement
Informatique théorique
Spectrochimie
Algèbre

AVANT-PROPOS

Je remercie Monsieur le Professeur CAPURON de m'avoir accueilli dans son laboratoire, qu'il sache combien j'ai été sensible à la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ce travail.

Monsieur le Professeur HOUILLON a accepté de bien vouloir examiner ce travail, qu'il soit assuré de toute ma gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur GIPOULOUX d'avoir bien voulu juger ce manuscrit.

Monsieur le Professeur NIEUWKOOP me fait l'honneur de participer à mon jury de thèse, qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Après avoir participé au jury de ma thèse de III cycle, Monsieur le Professeur BART a bien voulu être encore présent lors de cette soutenance. Je ne saurais trop le remercier de l'intérêt qu'il me témoigne ainsi.

Je ne saurais terminer sans remercier tous ceux qui, à titre divers, m'ont permis de mener à bien ce travail. J'adresse tout particulièrement mes remerciements à Madame ANDRIES pour la qualité de l'aide technique qu'elle m'a apportée, Madame LALOUX pour la dactylographie de ce manuscrit, Monsieur CHUIN, responsable de l'entretien des élevages, Madame AUGER et Monsieur LAZARECKI pour l'ensemble des reproductions photographiques. Qu'il me soit aussi permis de remercier Mademoiselle ROUSSEAU et Monsieur LASSALLE qui, avec compétence, ont participé à la mise en page de ce mémoire.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
MATERIEL ET METHODES	3
CHAPITRE I : Localisation des c.g.p. au cours des premiers stades du développement.	7
1 - Neurulation	8
1-1. Méthode des ablations	8
1-2. Culture <i>in vitro</i>	9
2 - Gastrulation	10
2-1. Explantation <i>in vitro</i>	11
2-1-1. Culture en sandwich	11
2-1-1-1. Protocole opératoire	11
2-1-1-2. Résultats	12
2-2. Culture <i>in vivo</i> : implantation dans le blastocoele ----	14
2-2-1. Protocole opératoire	14
2-2-2. Résultats	15
2-3. Conclusion	16
3 - Segmentation	16
3-1. Etude de la zone marginale prélevée au stade 6	17
3-1-1. Protocole opératoire	17
3-1-2. Résultats	18
3-2. Etude de la zone marginale prélevée au stade 5	18
3-2-1. Protocole opératoire	18
3-2-2. Résultats	19
3-3. Discussion	19
CHAPITRE II : Origine et formation des c.g.p. Recombinaisons ectoderme-endoderme	23
1 - Recombinaison permanente	24

1-1. Protocole opératoire -----	24
1-2. Résultats -----	24
1-2-1. Recombinaisons d'endoderme ventral -----	25
1-2-2. Recombinaisons d'endoderme dorsal -----	27
1-2-3. Recombinaisons d'endoderme ventral et de chordo-mésoderme -----	27
1-3. Conclusion -----	28
2 - Recombinaison temporaire -----	30
2-1. Protocole opératoire -----	30
2-2. Résultats -----	30
2-3. Conclusion -----	32

CHAPITRE III : Mécanismes intervenant dans l'induction des

c.g.p. -----	34
1 - Culture transfiltre -----	36
1-1. Interposition de filtre normal -----	36
1-1-1. Protocole expérimental -----	36
1-1-2. Résultats -----	37
1-2. Interposition de filtre percé -----	38
1-2-1. Protocole opératoire -----	38
1-2-2. Résultats -----	38
1-3. Conclusion -----	39
2 - Rôle de l'endoderme dans la détermination des c.g.p. et du mésoderme -----	41
2-1. Culture en sandwich de mésoderme latéral associé à l'endoderme ventral -----	41
2-1-1. Protocole opératoire -----	41
2-1-2. Résultats -----	43
2-2. Greffe de mésoderme latéral sur un bourgeon caudal ----	44
2-2-1. Protocole opératoire -----	44
2-2-2. Résultats -----	45
2-3. Conclusion -----	46
3 - Interactions cellulaires précoces -----	47
3-1. Protocole opératoire -----	48
3-2. Résultats -----	49

3-3. Discussion	51
-----------------	----

DISCUSSION GENERALE	55
---------------------	----

PUBLICATIONS

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION GENERALE

L'origine et la mise en place des cellules germinales primordiales (c.g.p.) des Amphibiens ont suscité de nombreux travaux qui ont révélé des différences fondamentales entre Anoures et Urodèles. En particulier, les travaux de Bounoure (1927, 1931 et 1934) furent déterminants en révélant l'existence d'un plasme germinal chez l'Anoure *Rana temporaria*. Ce cytoplasme aux affinités tinctoriales particulières, situé au voisinage du pôle végétatif de l'oeuf indivis, se répartit ensuite au cours de la segmentation dans un certain nombre de blastomères qui constitueront les initiales germinales. De nombreuses recherches descriptives ont confirmé l'existence de ce plasme germinal chez d'autres espèces d'Anoures (Revue par Eddy, 1975). Localisé dès le stade ovocytaire, il a été observé à tous les stades précoces du développement dans les cellules germinales primordiales présomptives qui coloniseront les futures crêtes génitales. Des études ultrastructurales ont révélé qu'il est constitué par l'association de granules denses avec des mitochondries et des ribosomes (Balinsky, 1966 ; Mahowald et Hennen, 1971 ; Czolowska, 1972 ; Kalt, 1973 ; Gipouloux, 1975 ; Ikenishi et Kotani, 1975). Des études expérimentales ont montré que le cytoplasme germinal joue un rôle capital dans l'établissement de la lignée germinale des Anoures : seules les cellules ayant incorporé du plasme germinal sont capables de se différencier en c.g.p. Grâce à la présence de ce déterminant germinal, les c.g.p. présomptives peuvent être identifiées avec certitude et précision pendant toute leur existence endodermique, où elles prolifèrent, se différencient et migrent vers les crêtes génitales. L'origine endodermique des c.g.p. chez les Anoures est donc clairement établie. Comparativement chez les Urodèles, la situation est plus confuse. La présence d'un plasme germinal est très improbable. La seule observation de structures granulaires assimilables à celles décrites chez les Anoures fut publiée en 1971 par Williams et Smith. Elle concernait l'oeuf indivis d'*Axolotl*, mais cette observation n'a jamais été confirmée. Par contre, des granules germinaux ont été décrits à des stades avancés du développement. Ikenishi et Nieuwkoop (1978) ont réalisé une étude ultrastructurale des c.g.p. d'*Ambystoma mexicanum* à des stades larvaires (st. 23 à 47 de la table de développement de Schreckenberg et Jacobson, 1975) : des structures assimilables au "nuage" ou correspondant aux granules germinaux et à leurs dérivés n'apparaissent qu'après le stade 40. Hamasima et Kotani (1977) décrivent des structures identiques chez des larves âgées de *Triturus pyrrhogaster* (stade prise de nourriture). Chez les Urodèles, l'absence de plasme germinal pendant les phases initiales du développement rend donc difficile l'identification de la lignée germinale. Les c.g.p. ne sont

décelables, sur critères morphologiques, que lorsqu'elles sont déjà en place dans le mésoderme intermédiaire au cours des stades du bourgeon caudal.

Cette absence de marqueur chez les Urodèles explique pourquoi, pendant longtemps, l'origine, la localisation et la migration des cellules sont restées imprécises. Des résultats expérimentaux attestent pourtant de la présence des c.g.p. dans le mésoderme intermédiaire dès le stade gastrula. Nieuwkoop (1947) à la suite de transplantations hétéroplastiques de mésoderme latéral entre gastrulas moyennes de *Triturus alpestris* et *Triturus cristatus* conclut à l'origine mésodermique des c.g.p. Ces résultats sont cependant contestés, en particulier Amanuma (1957) qui estime que l'ablation du mésoderme latéral présomptif de la gastrula de *Triturus pyrrhogaster* ou d'*Hynobius nebulosus* n'affecte pas le nombre de gonocytes. Smith (1964) chez *Ambystoma mexicanum* démontre cependant grâce à des greffes de mésoderme latéral réalisées au stade gastrula entre les génotypes noir et blanc que les c.g.p. sont effectivement d'origine mésodermique et qu'elles sont les cellules mères des futurs gamètes. Ces quelques résultats suffisent à montrer la situation incertaine à laquelle on était parvenu en raison de la diversité des méthodes, des genres et des espèces, des stades utilisés. Une étape capitale est franchie en 1969 quand Nieuwkoop démontre expérimentalement que le mésoderme initial dérive exclusivement de l'ectoderme de l'hémisphère animal sous l'influence inductrice de l'hémisphère végétatif endodermique. La présence de c.g.p. parmi les structures mésodermiques induites conduit Sutasurya et Nieuwkoop (1974) à penser que chez les Urodèles, les c.g.p. se forment épigénétiquement à partir d'éléments somatiques totipotents de l'hémisphère animal de la blastula. Progressivement, s'imposait donc l'idée que chez les Urodèles, la lignée germinale avait une origine et une évolution radicalement différente de celle des Anoures qui jusque là avaient été pris comme modèle des Amphibiens en la matière. Entre temps, nous avons abordé expérimentalement l'étude de cette lignée avec la perspective d'en suivre le comportement chez un seul et même animal, le Pleurodèle. Les résultats rapportés dans ce mémoire concernent en premier lieu la localisation des c.g.p. depuis la blastula jusqu'au stade neurula. La deuxième partie, consacrée à l'origine de ces cellules, mettra en évidence qu'elles résultent bien d'une interaction ecto-endodermique au même titre que le mésoderme. La troisième partie aborde les mécanismes mis en jeu dans cette induction.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1) Espèce utilisée.

Toutes nos recherches ont été réalisées sur l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. Les embryons opérés proviennent de pontes naturelles obtenues au laboratoire. L'élevage et la reproduction de ces animaux ont été décrits par Gallien (1952). Le développement relativement lent des embryons permet d'opérer plusieurs jours sur la même ponte, pour cela, il suffit en effet de réchauffer ou de refroidir légèrement une partie des germes. Les stades ont été déterminés selon la table chronologique du développement établie par Gallien et Durocher (1957).

2) Techniques opératoires.

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

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

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

3 types principaux d'expériences ont été réalisés :

- ablations et transplantations
- culture *in vitro*
- culture *in vivo* (implantation dans le blastocoele)

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

- Ablations et transplantations

Le principe de l'intervention réside dans l'ablation élective et unilatérale d'un fragment d'ecto-mésoderme. On découpe un lambeau d'ectoderme avec le mésoderme sous-jacent dans la

région ventro-latérale de la neurula en prenant soin de ne pas léser le blastopore. Le matériel excisé se détache parfaitement de l'endoderme sur lequel il repose. La cicatrisation terminée, il est transféré dans une autre coupelle remplie de solution d'élevage (Holtfreter ou Steinberg stérile diluée au 1/10). Les animaux opérés sont ainsi élevés séparément jusqu'au stade 38 où ils sont sacrifiés. A ce stade, soit 17 jours environ après la ponte, les c.g.p. sont groupées en filots plus ou moins volumineux s'étirant le long des uretères primaires au niveau des crêtes génitales (Planche I. Fig. A et B). Nous avons choisi ce stade pour 2 raisons :

- un critère morphologique : le stade 38 est facilement identifiable, il est caractérisé par la présence des membres antérieurs en forme de palette échancrée ;
- un critère histologique : à ce stade, le vitellus est presque complètement résorbé et seuls les gonocytes primaires possèdent encore de volumineux granules vitellins.

On remarque leur grande dimension qui contraste avec celle des cellules avoisinantes, leur noyau plurilobé renferme 1 ou 2 nucléoles (Planche I. Fig. A et B).

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

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

- Culture *in vitro*

L'ébauche embryonnaire destinée à la mise en culture *in vitro* est prélevée sur le germe. Le fragment ainsi isolé est maintenu 1 à 2 heures dans la coupelle opératoire revêtue d'un fond d'agar. La cicatrisation achevée, il est placé dans une salière comportant un fond de gélose (13 ‰) et remplie du milieu de Barth et Barth (1959) ou du milieu de Holtfreter opératoire additionné de sérum de cheval (5%) et de 50 000 UI de pénicilline pour 100 ml de solution. Les salières sont ensuite placées en étuve à la température constante de 20°C. Après 15 jours de culture, nous fixons les explants qui se sont différenciés normalement.

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

- Culture *in vivo* (implantation dans le blastocoele)

Contrairement à la culture *in vitro*, l'explant embryonnaire isolé est maintenu dans des conditions plus proches de son milieu naturel. Il est introduit dans la cavité blastocoelienne d'une jeune gastrula encore entourée par son chorion. Sa maintenance favorisant considérablement le développement ultérieur du germe. Les individus opérés sont élevés séparément jusqu'au stade 38 où ils sont sacrifiés.

3) Techniques d'observation des résultats

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

CHAPITRE I

LOCALISATION DES C.G.P. AU COURS DES PREMIERS STADES DU DEVELOPPEMENT.

INTRODUCTION

Humphrey, dès 1925, met en évidence des c.g.p. au voisinage du canal de Wolff dans le mésoderme latéral des bourgeons caudaux d'*Hémidactylum* et d'*Ambystoma maculatum* (st. 21 de la table de Harrison). Ce même auteur (1927, 1928), à la suite d'ablations et de transplantations, confirme la localisation de ces cellules dans le mésoderme intermédiaire d'*Ambystoma maculatum* et *A. jeffersonianum*, à des stades relativement avancés du développement (st. 32 à 36 de la table de Harrison). Aux stades antérieurs du bourgeon caudal, la richesse généralisée en plaquettes vitellines et l'absence de caractères spécifiques ne permettent pas de distinguer les c.g.p. des autres cellules embryonnaires. Seules des méthodes expérimentales pouvaient résoudre les problèmes posés. Nieuwkoop (1947) réalise un important travail expérimental dont les résultats confirment l'origine mésodermique des c.g.p. Cependant, tous ces résultats ne font pas l'unanimité des embryologistes. Takamoto (1953) constate l'absence complète des c.g.p. après ablation totale de l'endoderme de la neurula âgée de *Triturus pyrrhogaster*. Amanuma (1957) et Asayama (1950, 1961) à la suite d'ablations de mésoderme latéral présomptif chez des gastrulas moyennes, des jeunes neurulas et des bourgeons caudaux de *Triturus pyrrhogaster* et *Hynobius nebulosus*, parviennent à des résultats différents. Ils estiment que les c.g.p. ne sont pas encore déterminées au stade neurula et qu'une régulation est possible à partir du mésoderme latéral à un stade aussi avancé que celui du bourgeon caudal. Asayama et Amanuma (1957), après avoir greffé la lèvre dorsale blastoporale dans la zone marginale ventrale d'un embryon de *Hynobius nebulosus*, considèrent que les c.g.p. sont induites de *novo* par l'embryon secondaire induit. Cette interprétation est contestée par Capuron (1968) qui montre que, chez le Pleurodèle, les c.g.p. de l'embryon secondaire proviennent du stock initial de l'hôte, ces cellules se répartissant entre les crêtes génitales normales et surnuméraires. Dans le cadre de ce travail, nous avons tenté de localiser les c.g.p. aux stades les plus précoces du développement, en étudiant successivement la neurulation, la gastrulation et la segmentation.

1 - Neurulation

Chez le Pleurodèle, Houillon (1956) a établi que les gonocytes sont identifiables de manière certaine, grâce à des critères histologiques, vers le 12ème jour du développement, ce qui correspond au stade 33. En outre, le stock de cellules germinales présent à ce stade reste constant chez un individu donné jusqu'à l'âge de 4 semaines, moment où débute la multiplication. C'est sur cette particularité qu'est basé le principe des premières opérations réalisées, toute ablation unilatérale d'un territoire supposé contenir tout ou partie des c.g.p. doit entraîner un déficit du nombre de gonocytes du côté correspondant, sous réserve que la numération soit faite avant l'âge de 4 semaines et qu'il n'y ait pas de régulation.

Une étude préalable, réalisée sur 22 individus témoins, nous a permis de constater, qu'en dépit de certaines variations individuelles, la moyenne était environ de 100 gonocytes par larve, ($m = 96,23 \pm 31,73$) répartis de manière comparable entre les crêtes génitales droite et gauche (Publication n°1).

Ces valeurs sont voisines de celles publiées par Houillon (1956).

Pour pallier les inconvénients de cette démonstration par défaut, nous avons procédé, dans un second temps, à la culture des territoires supposés contenir les c.g.p.

1-1. Méthode des ablations.

L'ablation complète, au stade jeune neurula, du mésoderme latéral présomptif chez *Ambystoma mexicanum*, réalisée par Nieuwkoop (1947) entraînait la stérilité totale chez 4 individus opérés sur 7. La réduction était importante dans les autres cas. Nous avons repris ces expériences chez le Pleurodèle.

La première méthode a consisté en l'ablation unilatérale d'un fragment ecto-mésodermique en position ventrale postérieure décrit dans la figure 1.

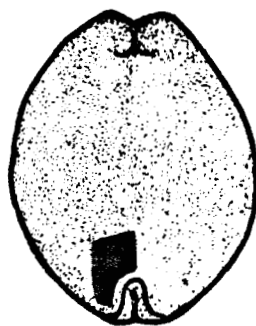


Fig. 1 : Ablation d'ecto-mésoderme ventral au stade neurula.

Stades Prélèvement	Nombre Opérations	Explants Différenciés	Cas avec c.g.p.	Moyenne c.g.p.
st 15	35	30	20	29,80 ± 28,99
st 17	28	20	16	50,50 ± 28,59
st 19/20	22	18	17	66,61 ± 30,96
Totaux	85	68	53	

Tableau 1 - Différenciation de c.g.p. dans les cultures de mésoderme latéral présomptif prélevé au cours de la neurulation.

Numéro de l'expérience	Nombre de c.g.p.
1	3
2	6
3	17
4	46
5	16
6	36
7	22
8	20
T = 8	M = 21 ± 13



Tableau 2 - Numérations gonocytaires réalisées après culture en sandwich de mésoderme latéral prélevé sur des jeunes neurulas (st. 15) et inséré dans un lambeau d'épiblaste.

Les résultats de nos expériences d'ablations ayant fait l'objet d'un travail antérieur (Maufroid et Capuron, 1972, nous nous limiterons à n'en rapporter ici que les conclusions (Publication n°1). Les ablations localisées d'ecto-mésoderme entraînent l'absence ou la réduction des gonocytes du côté opéré. Au stade de la jeune neurula (st. 15), elles sont localisées au voisinage du blastopore en position ventrale et latérale par rapport à ce dernier. Aucun changement ne survient au cours de la neurulation. C'est aux environs du stade 22 (jeune bourgeon caudal) que les cellules germinales quittent leur position initiale pour atteindre le mésoderme intermédiaire au stade 23/24. Afin de confirmer ces résultats, nous avons procédé à la mise en culture de ce territoire.

1-2. Culture in vitro.

Le territoire excisé bilatéralement correspond à l'ensemble du mésoderme latéral présomptif déjà invaginé et à celui, en particulier le mésoblaste caudal, encore présent en surface autour de la fente blastoporale. Afin de s'assurer de la présence du maximum de c.g.p., l'ablation a été étendue à toute la région bordant le blastopore (Fig.2).

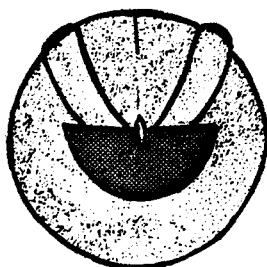


Fig. 2 : Localisation du secteur ecto-mésodermique isolé et mis en culture au stade neurula.

Le territoire excisé comporte du tissu nerveux (extrémité postérieure des bourrelets neuraux), de l'ectoderme et des tissus mésodermiques (mésoderme latéral et caudal, une partie des somites), seul le feuillet endodermique en est exclu. Les opérations sont réalisées aux stades 15, 17 et 19/20.

Les explants forment des vésicules limitées par un épithélium épidermique doublé d'une somatopleure d'où sont issues des lames mésothéliales. Ces dernières forment un réseau délimitant toute une série de cavités. Sur 68 explants différenciés (Tableau 1), 53 contiennent des c.g.p. le plus souvent groupées en un seul îlot inclus dans le mésenchyme somatopleural ou emballé dans une travée mésothéliale (Planche I, Fig. C). Il existe une grande fluctuation dans le nombre de

Numéro de l'expérience	Nombre de c.g.p.	
	Germe donneur	Explant correspondant
B16	0	29
B17	0	-
B18	0	17
B19	0	-
B20	0	23
B21	10	-
N1	2	59
N3	0	62
N4	5	-
N6	0	75
N9	2	-
N12	0	-
N15	2	-
S1	0	86
S2	0	-
S3	0	60
S4	0	164
S5	0	91
S6	0	95
S7	0	81
S8	0	112
S9	0	88
S10	0	74
S11	0	67
T = 24		m=73,93±35,73

Tableau 3 - Numérations gonocytaires réalisées après ablation de l'ecto-mésoderme latéral de jeune neurula (st. 15) chez les larves opérées et les explants correspondants.

(-) explant non analysé.

gonocytes d'une expérience à l'autre, les moyennes des différents stades (29,8, 50,5 et 66,6) varient avec l'âge du donneur. On note cependant une progression sensible en cours de neurulation. L'efficacité de l'opération est maximale au stade 19/20, par comparaison avec la moyenne des larves non opérées ($96,23 \pm 31,73$) on constate un déficit important que l'on peut attribuer à la technique opératoire. On peut en effet estimer qu'une partie des c.g.p. se trouve éliminée au cours de la mise en culture et de la cicatrisation.

Pour préciser la localisation mésodermique des c.g.p., dans un certain nombre de cas, nous avons essayé de séparer l'ectoderme du mésoderme latéral présomptif. Cette opération n'est pas aisée car le feuillet mésodermique est très mince. Le mésoderme latéral isolé est ensuite inséré dans un lambeau d'épiderme présomptif. Le "sandwich" ainsi constitué est mis en culture *in vitro* dans les conditions habituelles.

L'examen histologique de quelques explants (Tableau 2) a révélé la présence effective de c.g.p. au sein des dérivés mésodermiques issus de la différenciation du mésoderme prélevé, mésenchyme et lames latérales.

Nous avons également vérifié l'efficacité de l'ablation bilatérale en élevant d'une part, le germe donneur pendant 2 semaines et en cultivant le fragment ecto-mésodermique pendant le même temps, d'autre part. Les résultats des numérations gonocytaires pratiquées sur l'explant et les crêtes génitales de la larve opérée sont rassemblés dans le tableau 3. Dans 19 cas sur 24, l'opération a entraîné une stérilité complète des larves. Les explants correspondants mis en culture et qui ont pu être analysés renfermaient tous des c.g.p. en nombre variable. Ces résultats confirment nos précédentes observations, les c.g.p. sont toutes localisées dans la région ventro-latérale du blastopore. L'ablation complète de ce territoire au début de la neurulation peut entraîner une stérilisation complète de la larve sans possibilité de régulation.

2 - Gastrulation

Les résultats de Nieuwkoop (1947) et Smith (1964) laissaient supposer qu'au cours de la gastrulation, les g.c.p. étaient situées dans le mésoderme ventro-latéral présomptif. Compte tenu des résultats rapportés dans le paragraphe précédent, c'est donc dans ce territoire que nous avons tenté de les localiser. Nous avons réalisé l'ablation élective de fragments de gastrulas prélevés à divers stades, depuis l'apparition de l'encoche blastoporale (st. 8a) jusqu'à sa fermeture au st. 13. Les premiers essais de culture ayant échoué, les explants se dissociant en cours de culture, nous nous sommes orientés vers la technique de culture en sandwich (Holtfreter, 1933), technique qui devait réduire les risques de dissociation. Dans un second temps, après examen des résultats

obtenus, nous avons mis en oeuvre une autre technique de culture *in vivo* qui fait appel à l'implantation intrablastocoelienne.

2-1. Explantation *in vitro*.

2-1-1. Culture "en sandwich"

2-1-1-1. Protocole opératoire.

Un fragment de mésoderme latéral présomptif, représentant le 1/4 de l'ensemble du territoire est inséré dans une tranche d'ectoderme prélevée sur un autre germe dont le stade (blastula âgée) a été choisi en vertu de ses aptitudes à recouvrir rapidement le fragment. La figure 3 retrace le protocole opératoire employé. Les sandwichs ainsi réalisés sont mis en culture selon la technique déjà relatée.

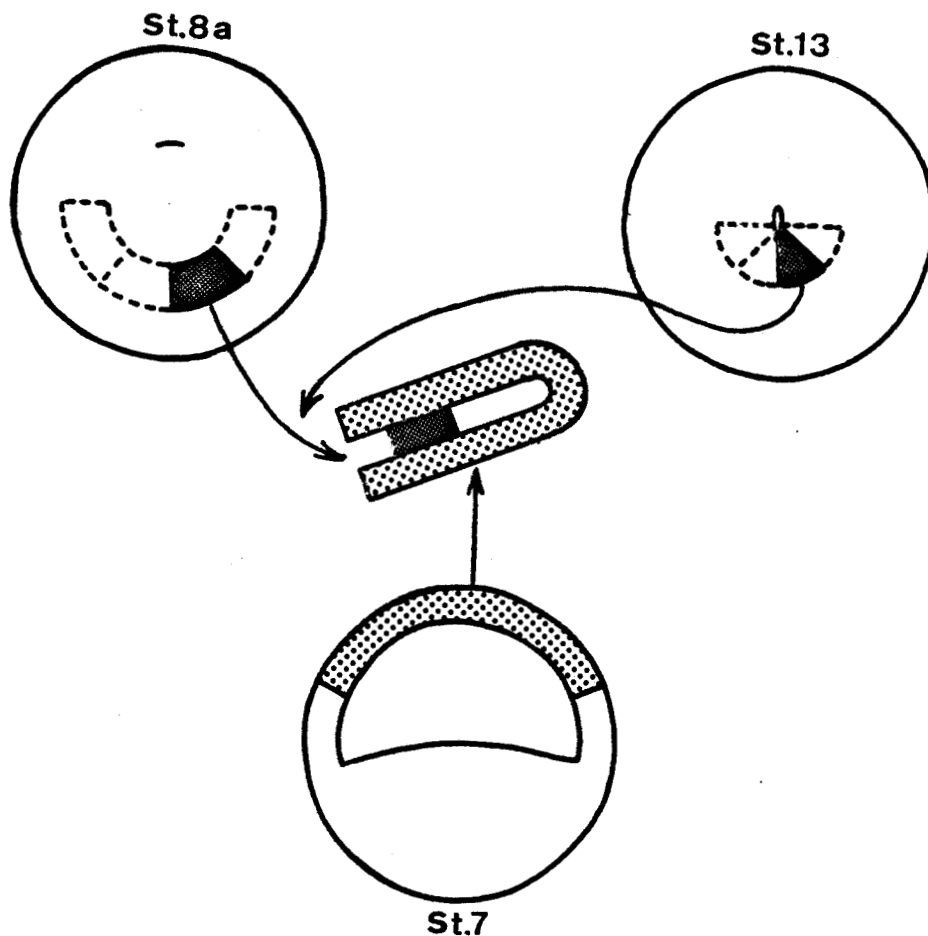


Fig. 3 : Représentation du secteur de mésoderme latéral présomptif prélevé à différents stades de la gastrulation (st. 8a à 13) et mis en culture dans un lambeau d'épiblaste isolé sur une blastula âgée.

Exp. ML 8a	Méso.	Mésén.	T. Néphr.	c.g.p.	
1	+	+	+	0	
2	+	+	+	0	
3	+	+	-	0	
4	+	+	+	2	
5	+	+	-	0	
6	+	+	-	0	
7	+	+	-	0	
8	+	+	+	0	
9	+	+	-	0	
10	+	+	+	0	
11	+	+	-	0	
12	+	+	+	0	
13	+	+	+	0	
14	+	+	+	0	
15	+	+	+	0	
16	+	+	-	0	
17	+	+	+	0	
18	+	+	+	0	
19	+	+	+	0	
20	+	+	-	0	
T= 20 (%)	20 (100)	20 (100)	12 (60)	1 (5)	

Tableau 4 - Différenciations obtenues après culture en sandwich de fragments de mésoderme latéral prélevés au stade 8a. (+) Présence
(-) Absence

Exp. ML 10	Méso.	Mésén.	T. Néphr.	c.g.p.	
1	+	+	-	0	
2	+	+	-	0	
3	+	+	-	0	
4	-	-	-	0	
5	+	+	-	0	
6	+	+	-	0	
7	-	-	-	0	
8	+	+	-	0	
9	+	+	-	0	
10	+	+	-	0	
11	+	+	-	0	
T=11 (%)	9 (82)	9 (82)	0 (0)	0 (0)	

Tableau 5 - Différenciations obtenues après culture en sandwich de fragments de mésoderme latéral prélevés au stade 10. (+) Présence
(-) Absence

2-1-1-2. Résultats

4 séries expérimentales ont été réalisées couvrant 4 stades successifs de la gastrulation : 8a, 10, 12 et 13. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux 4, 5, 6 et 7.

Exp. ML 12	Méso.	Mésen.	T. Néphr.	c.g.p.	
1	+	+	+	15	
2	+	+	+	40	
3	+	+	+	26	
4	+	+	+	6	
5	+	+	-	0	
6	+	+	+	55	
7	+	+	+	10	
8	+	+	+	72	
9	+	+	+	55	
10	+	+	+	53	
11	+	+	+	0	
12	+	+	+	33	
13	+	+	+	0	
14	+	+	-	0	
15	+	+	+	6	
16	+	+	+	49	
T=16 (%)	16 (100)	16 (100)	14 (87,5)	12 (75) m=26,27 ± 24,71	

Tableau 6 - Différenciations obtenues après culture en sandwich de fragments de mésoderme latéral prélevés au stade 12. (+) Présence
(-) Absence



Exp. ML 13	Méso.	Mésén.	T. Néphr.	c.g.p.
1	+	+	-	0
2	+	+	-	11
3	+	+	-	20
4	+	+	-	9
5	+	+	-	0
6	+	+	+	17
7	+	+	+	11
8	+	+	-	0
9	+	+	-	16
10	+	+	-	0
11	+	+	+	16
12	+	+	-	3
13	+	+	+	48
14	+	+	+	18
15	+	+	+	4
16	+	+	+	0
17	+	+	-	37
18	+	+	-	22
19	+	+	-	0
20	+	+	+	11
21	+	+	+	0
22	+	+	+	0
23	+	+	+	0
24	+	+	+	13
25	+	+	+	12
26	+	+	+	2
27	+	+	-	0
T=27 (%)	27 (100)	27 (100)	14 (51,8)	17 (62,9) m=10±12

Tableau 7 - Différenciations obtenues après culture en sandwich de fragments de mésoderme latéral prélevés au stade 13. (+) Présence
(-) Absence



Stade de Prélèvement	n	Mésén.	Méso.	T. Néphr.	c.g.p.
st 8a	20	20 (100)	20 (100)	12 (60)	1 (5)
st 10	11	9 (82)	9 (82)	0 (0)	0 (0)
st 12	16	16 (100)	16 (100)	14 (87,5)	12 (75)
st 13	27	27 (100)	27 (100)	14 (51,8)	17 (62,9)

Tableau 8 : Différenciations obtenues après culture en sandwich de mésoderme latéral prélevé à divers stades de la gastrulation.
() fréquence des structures obtenues.

De manière générale, les explants évoluent en vésicules, de taille variable entourées d'un épithélium. Un mésenchyme tapisse le revêtement externe d'origine épidermique, tout en émettant de minces travées au travers de la cavité vésiculaire (Planche II, Fig. A à F). Des tubules néphrétiques sont parfois accolés à ces lames mésothéliales. Les c.g.p., quand elles sont présentes, constituent un îlot situé soit dans le mésenchyme de l'enveloppe soit au voisinage des structures néphrétiques (Planche II. Fig. C, D, E et F). La comparaison des résultats réunis dans le tableau 8 montre que le mésoderme latéral présomptif est capable d'autodifférenciation dès le stade 8a, mis en culture en sandwich, il évolue conformément à ses valeurs présomptives et se différencie dans la majorité des cas en mésenchyme, mésothélium et tubules néphrétiques (une exception cependant pour la série (ML st. 10). L'autre point important concerne la fréquence d'apparition des c.g.p., dans les 2 premières séries (ML 8a et ML 10) les c.g.p. n'apparaissent qu'exceptionnellement (1 seul cas dans la série ML 8a). Au contraire, dans les 2 dernières séries (ML12 et ML13), les c.g.p. s'observent fréquemment et nous obtenons des taux élevés de différenciation, 75% au stade 12 et 62,9% au stade 13. Ces résultats plaident en faveur d'une détermination progressive des c.g.p. en cours de gastrulation. La culture en sandwich s'étant révélée inefficace aux stades initiaux de la gastrulation, il nous a semblé que l'implantation de ce territoire dans le blastocoele d'une gastrula fournirait des conditions plus favorables à leur différenciation.

2-2. Culture *in vivo* : implantation dans le blastocoele.

2-2-1. Protocole opératoire.

La zone marginale ventrale et ventro-latérale de la gastrula, prélevée aux stades 8a, 9 et 10

est découpée en 4 secteurs conformément à la figure 4. Chaque fragment ainsi délimité est introduit dans le blastocoele d'une jeune gastrula. Les individus hôtes sont ensuite élevés séparément jusqu'au stade 38 où ils sont sacrifiés.

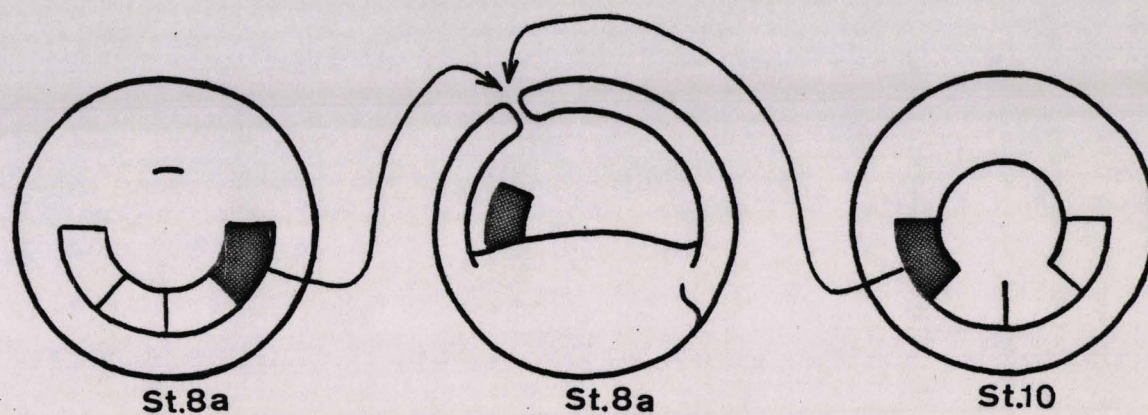


Fig. 4 : Représentation des différents secteurs prélevés au niveau de la zone marginale ventrale et ventro-latérale et implantés dans le blastocoele d'une gastrula.

2-2-2. Résultats.

Quelque soit le type d'opération réalisé, le fragment implanté se localise généralement dans la région moyenne du tronc en formant des excroissances en position plus ou moins ventrale. Au sein des dérivés mésodermiques tels que cellules sanguines et mésenchymateuses, des gonocytes ont été dénombrés dans 74,7 % des cas (Tableau 9). Les résultats obtenus dans ce type d'opération ont fait l'objet d'une publication (Mauroid et Capuron, 1973) et nous ne relaterons, dans ce mémoire, que les conclusions essentielles (Publication n°2).

Nombre de cas							
stade 8a		stade 9		stade 10		Totaux	
Exp.	avec c.g.p.	Exp.	avec c.g.p.	Exp.	avec c.g.p.	Exp.	avec c.g.p.
33 (%)	30 (90,9)	33	24 (72,7)	25	14 (56)	91	68 (74,7)

Tableau 9 : Différenciation de c.g.p. dans le mésoderme latéral de gastrula après implantation intrablastocœlienne.

Les cellules germinales surnuméraires des larves opérées se localisent toujours au sein des structures issues des lames latérales sous la forme d'îlots bien individualisés, leur association constante avec la somatopleure ou la splanchnopleure est conforme à la nature présomptive du territoire dont elles dérivent (Planche I. Fig. D et E). Ceci montre que les c.g.p. présentes dans un secteur se différencient sur le lieu même de son implantation dans le blastocoele et échappent à toute influence attractive provenant de l'hôte. Nos résultats démontrent que les c.g.p. sont situées au sein du mésoderme latéral présomptif dès l'apparition de l'encoche blastoporale (st 8a). Les c.g.p. sont dispersées dans tout le mésoderme latéral, Smith (1964) a fait la même constatation chez l'*Axolotl*.

2-3. Conclusion

L'ensemble de nos résultats relatifs à la gastrula permet de conclure que dès le début de la gastrulation, les c.g.p. sont présentes au sein du mésoderme latéral présomptif. Au cours de la première moitié de la gastrulation, elles n'auraient pas encore acquis une complète détermination. Celle-ci s'établirait progressivement dans le cadre d'interactions tissulaires complémentaires avec l'endoderme. La différenciation des c.g.p. dans de fortes proportions lorsque le mésoderme latéral est implanté dans le blastocèle où il subit l'influence des tissus environnants plaide en faveur de cette hypothèse.

3 - Segmentation

La présence des c.g.p. dans le mésoderme latéral présomptif de la jeune gastrula étant maintenant clairement établie, on pouvait s'interroger sur leur existence aux stades plus précoces de la segmentation. Nos recherches se sont donc poursuivies avec l'étude des stades 5 et 6 (blastula jeune et moyenne) où nous avons réalisé l'explantation *in vitro* de fragments de la zone marginale. Si on consulte la littérature, on constate que cette phase du développement a été peu étudiée, Holtfreter (1938) a bien effectué des expériences similaires mais sur de jeunes gastrulas. Les premiers travaux sont réalisés par Nakamura et Matsuzawa (1967) chez *Triturus pyrrhogaster*, ces auteurs ont analysé la capacité de différenciation de secteurs dorsaux, latéraux et ventraux découpés dans la zone marginale de germes arrivés aux stades morula et jeune blastula. La difficulté principale que l'on rencontre lorsqu'on étudie cette phase du développement est d'orienter correctement l'embryon. En effet, la zone dépigmentée, le croissant gris, qui marque normalement la future face dorsale de l'embryon n'est bien visible que chez les Anoures. Chez le Pleurodèle par contre, cette zone n'est pas toujours très apparente et souvent elle disparaît au cours de la segmentation. Il s'avérerait donc nécessaire de marquer au préalable la future face dorsale en posant une marque colorée au début de la segmentation.

Nous avons vérifié l'efficacité de ce marquage en plaçant un fragment d'agar imprégné de rouge neutre ou de sulfate de bleu de Nil contre la zone dépigmentée de germes isolés au stade 2 cellules. La lecture est effectuée au stade jeune gastrula. Dans 19 cas sur 28 (c'est-à-dire dans 68% des cas), la coloration est localisée exactement dans le chordo-mésoblaste présomptif au-dessus de la lèvre dorsale du blastopore, dans 8 autres cas (29%), la marque est retrouvée au niveau du territoire présomptif des somites, le dernier cas est illisible. Les résultats montrent que chez le Pleurodèle, il est possible d'isoler des secteurs dorsaux ou ventraux de la zone marginale dans de bonnes conditions, les risques d'erreur étant limités.

3-1. Etude de la zone marginale prélevée au stade 6.

3-1-1. Protocole opératoire.

Les germes choisis parmi ceux qui présentent une symétrie bilatérale bien apparente sont marqués au stade 2 blastomères. Une marque colorée est posée à l'emplacement du croissant dépigmenté, chaque germe ainsi orienté est élevé jusqu'au stade 6. Nous prélevons sur chaque embryon 2 fragments, le premier dans la zone marginale dorsale et le second dans la zone marginale ventrale comme le montre la figure 5. Les secteurs excisés sont situés à la limite de la zone pigmentée de l'hémisphère animal au contact des blastomères végétatifs plus volumineux. Les explants sont ensuite mis en culture en "sandwich" selon la technique habituelle.

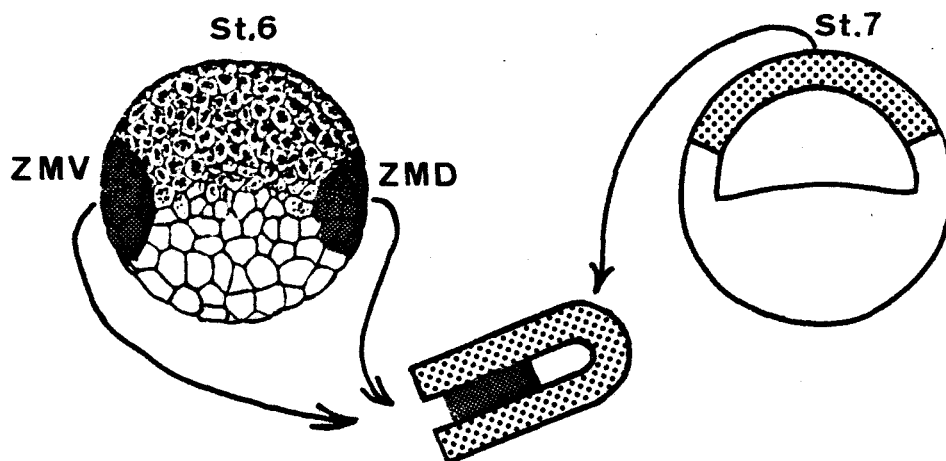


Fig. 5 : Représentation du secteur prélevé dans la zone marginale d'une blastula moyenne (stade 6) et cultivé en sandwich dans un lambeau d'épiblaste prélevé au stade 7.

stade 6	Ch.	Myo.	T. Néphr.	Mésén.	Méso.	Str. Neu.	C. otique	c.g.p.
1ère série								
v1	-	-	-	-	-	-	-	0
d1	-	-	-	-	-	-	-	0
v2	-	-	-	+	+	-	-	0
d2	-	-	-	-	-	-	-	0
v3	-	-	-	+	+	-	-	0
d3	+	-	+	+	+	+	-	0
v4	-	-	-	-	-	-	-	0
d4	-	-	-	+	+	-	-	0
v5	-	-	-	-	-	-	-	0
d5	-	-	-	-	-	-	-	0
v6	-	-	-	+	+	-	-	0
d6	-	-	-	+	+	-	-	0
v7	-	-	-	-	-	-	-	0
d7	+	+	-	+	+	+	-	0
v8	-	-	-	+	-	-	-	11
d8	-	-	-	-	-	-	-	0
2ème série								
v1	-	-	-	-	-	-	-	0
d1	+	+	-	+	+	+	+	0
v2	-	-	-	+	+	-	-	65
d2	+	+	+	+	+	+	+	0
v3	-	-	-	-	-	-	-	0
d3	+	+	+	+	+	+	+	0
v4	-	-	-	+	+	-	-	126
d4	+	+	+	+	+	+	+	0
v5	-	-	-	-	-	-	-	0
d5	+	+	+	+	+	+	+	0
v6	-	-	-	-	-	-	-	0
d6	+	+	-	+	+	+	+	0
v7	-	-	-	+	+	-	-	34
d7	+	+	-	+	+	+	+	0
v8	-	-	-	-	-	-	-	0
d8	+	+	-	+	+	+	+	0

Tableau 10 - Capacité de différenciation de 2 secteurs de la zone marginale prélevés au st. 6 et cultivés en "sandwich".

(+) Présence

(-) Absence

v secteur ventral

d secteur dorsal



3-1-2. Résultats

Les explants évoluent en vésicules épidermiques dont l'aspect morphologique diffère en fonction de l'origine des tissus prélevés. Les vésicules issues de la culture d'un fragment de la zone marginale dorsale (ZMD) présentent souvent un aspect organisé, reflétant une symétrie dorso-ventrale prononcée (Planche III. Fig. A).

Au contraire, un fragment de la zone marginale ventrale (ZMV) mis en culture, ne donne naissance qu'à une vésicule de forme arrondie, apparemment dépourvue de structures axiales (Planche III. Fig. B). L'examen histologique confirme ces observations, il permet de décrire 2 types d'organisation :

- Le premier concerne les explants issus de la ZMD. Il existe une symétrie très accusée avec la présence de structures axiales dorsales très développées. Une chorde surmontée d'un tube neural et flanquée de myotomes occupe fréquemment l'un des pôles de la vésicule (Planche III. Fig. E et F). Les structures neurales sont de type céphalique et des capsules otiques sont parfois observées (Planche III. Fig. F).

- Le second est relatif aux explants issus de la ZMV. Les structures axiales n'apparaissent jamais. Les vésicules épidermiques, tapissées par du mésenchyme, possèdent une vaste cavité centrale limitée par un mésothélium (Planche III. Fig. C). Nous avons observé des c.g.p. dans 4 cas sur 16 (Tableau 10) ces cellules forment un îlot isolé dans le mésenchyme ou emprisonné dans une travée traversant la cavité centrale (Planche III. Fig. C et D). Les numérations gonocytaires révèlent une grande variabilité (respectivement 11, 65, 126 et 34 c.g.p.).

3-2. Etude de la zone marginale prélevée au stade 5 (jeune blastula).

3-2-1. Protocole opératoire.

A ce stade, les fragments de la zone marginale que l'on isole ne renferment que quelques cellules volumineuses (Fig. 6).

C'est le stade le plus jeune que l'on puisse opérer. Les blastomères appartenant à la zone marginale contiennent vraisemblablement de l'ectoderme et de l'endoderme présomptif et il faudra en tenir compte dans l'interprétation des résultats. Un marquage cellulaire sélectif par la HRP (Horse Radish Peroxydase) ou la FLDx (Fluorescein-lysine-dextran) permettrait de connaître la descendance des cellules prélevées et de s'assurer ainsi des potentialités réelles de ces cellules. Les explants isolés sont mis en culture "en sandwich" selon le même protocole que celui utilisé au stade 6.

stade 5	Ch.	Myo.	T. Néphr..	Mésén.	Méso.	Str. Neu.	C. otique	c.g.p.
1ère série								
v1	-	-	-	-	-	-	-	0
d1	-	-	-	+	+	-	-	0
v2	-	-	-	-	-	-	-	0
d2	+	-	-	-	-	+	-	0
v3	-	-	-	+	+	-	-	0
d3	+	-	+	+	+	+	+	0
v4	-	-	+	+	+	-	-	0
d4	+	+	+	+	+	+	+	0
v5	-	-	-	-	-	-	-	0
d5	+	+	+	+	+	+	-	0
v6	-	-	-	+	+	-	-	56
d6	+	+	+	+	+	+	-	0
v7	-	-	-	+	+	-	-	0
d7	+	-	-	-	-	+	-	0
v8	-	-	-	+	+	-	-	0
d8	+	+	+	+	+	+	-	0
2ème série								
v1	-	-	-	-	-	-	-	0
d1	-	-	-	+	+	-	-	0
v2	-	-	-	-	-	-	-	0
d2	+	+	+	+	+	+	-	0
v3	-	-	-	+	+	-	-	0
d3	-	-	-	-	-	-	-	0
v4	-	-	-	-	-	-	-	0
d4	+	+	-	+	+	+	-	0
v5	-	-	-	-	-	-	-	0
d5	-	-	-	-	-	-	-	0
v6	-	-	-	-	-	-	-	0
d6	-	-	-	-	-	-	-	0
v7	-	-	-	-	-	-	-	0
d7	-	-	-	-	-	-	-	0
v8	-	-	-	+	+	-	-	0
d8	-	-	-	-	-	-	-	0
v9	-	-	-	+	+	-	-	0
d9	+	-	-	+	+	+	-	0
v10	-	-	-	-	-	-	-	0
d10	-	-	+	+	+	-	-	0
v11	-	-	-	+	+	-	-	46
d11	-	-	-	-	-	-	-	0
v12	-	-	-	+	+	-	-	0
d12	+	-	+	+	+	+	-	0

Tableau 11 - Capacité de différenciation de 2 secteurs de la zone marginale prélevés au st. 5 et cultivés en "sandwich".



(+) Présence

(-) Absence

v secteur ventral

d secteur dorsal

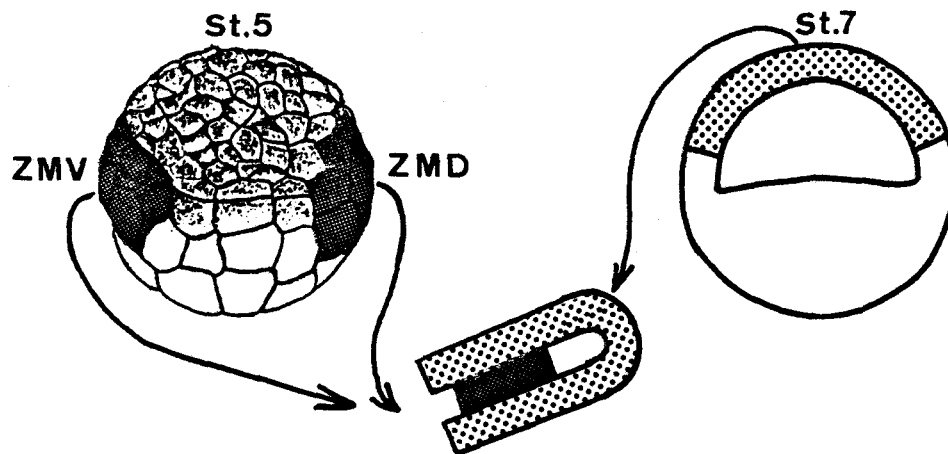


Fig. 6 : Représentation du secteur prélevé dans la zone marginale d'une blastula jeune (stade 5) et cultivé en sandwich dans un lambeau d'épiblaste prélevé au stade 7.

3-2-2. Résultats

Les vésicules issues de la culture des secteurs dorsaux et ventraux de la zone marginale paraissent identiques (Planche IV. Fig. A et B), néanmoins l'étude histologique révèle des degrés d'organisation proches de ceux décrits au stade 6.

La moitié des prestations issues de la ZMV renferment du mésenchyme et un mésothélium (Tableau 11). Ces dérivés mésodermiques sont peu abondants (Planche IV. Fig. C), leur richesse en plaquettes vitellines traduit une différenciation incomplète. Les c.g.p. ne sont observées que dans 2 cas, elles sont groupées en îlot dans le mésenchyme tapissant l'épithélium épidermique (Planche IV. Fig. C et D). Les prestations issues de la ZMD sont plus riches en dérivés mésodermiques. Chorde et myotomes occupent souvent toute la vésicule et des structures neurales céphaliques accompagnent fréquemment leur différenciation (Planche IV. Fig. E et F). Mésenchyme et mésothélium apparaissent dans la majorité des cas (Tableau 11).

3-3. Discussion

Les résultats que nous avons obtenus chez le Pleurodèle montrent que la zone marginale semble déterminée dès le stade jeune blastula. En effet, l'explantation *in vitro*, au stade 5, de

portions de la ZMD et de la ZMV fournit des dérivés mésodermiques variés (Tableau 12). Ces dérivés sont plus fréquents et diversifiés au niveau dorsal, chorde et myotomes sont présents dans 30% des cas et des structures neurales céphaliques accompagnent leur différenciation dans 55% des cas. Mésenchyme et mésothélium apparaissent dans les secteurs dorsaux et ventraux selon des fréquences voisines. Quelques tubules néphrétiques sont observés dans les secteurs dorsaux. Au stade 6, de manière générale, les dérivés mésodermiques issus de la ZMD sont plus fréquents, l'évolution n'est pas la même pour les structures fournies par la ZMV où seules les c.g.p. voient leur taux de différenciation progresser (de 10 à 25%).

Stade 5	N	Ch.	Myo.	T. Néphr.	Mésen.	Méso.	Str.Neu.	C.Otiq.	c.g.p.
ZMV	20 (%)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	10 (50)	10 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (10)
ZMD	20	11 (55)	6 (30)	7 (35)	12 (60)	12 (60)	11 (55)	2 (10)	0 (0)
Stade 6									
ZMV	16	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (43,7)	6 (37,5)	0 (0)	0 (0)	4 (25)
ZMD	16	10 (62,5)	9 (56,2)	5 (31,2)	12 (75)	12 (75)	10 (62,5)	8 (50)	0 (0)

Tableau 12 - Fréquence des structures obtenues après culture en "sandwich" de 2 secteurs de la zone marginale prélevés aux stades 5 et 6.

ZMV = zone marginale ventrale

ZMD = zone marginale dorsale

N = nombre d'expériences.



Ces résultats montrent que la zone marginale est régionalisée dès le stade 5, chorde et myotomes ne se différencient qu'au niveau dorsal alors que les c.g.p. n'apparaissent qu'au niveau ventral. On peut s'étonner cependant de l'absence des cellules sanguines qui caractérisent normalement la différenciation de la ZMV (Nakamura et Matsuzawa, 1967). La comparaison des fréquences des

tissus différenciés à partir des secteurs dorsaux et ventraux de la zone marginale aux stades 5 et 6 (Fig. 7) indique que les dérivés mésodermiques apparaissent plus fréquemment dans les secteurs dorsaux, cela peut signifier que cette zone possède un degré de détermination plus élevé. Nakamura et Matsuzawa (1967) ont publié des résultats voisins chez *Triturus pyrrhogaster*, ils ne signalent pas la présence d'éventuelles c.g.p. Ces auteurs affirment que la capacité de différenciation de la

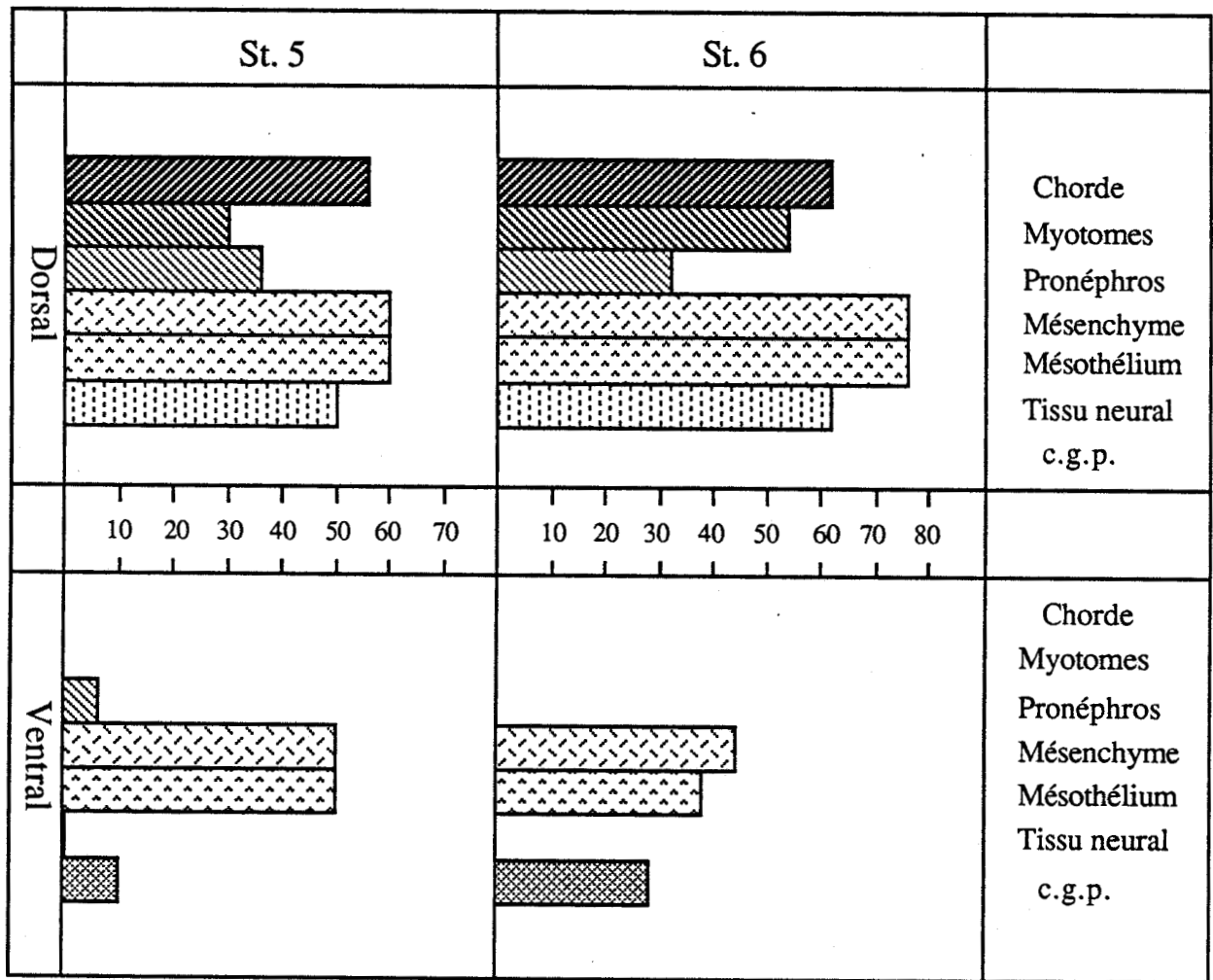


Figure 7 - Diagrammes de la fréquence des tissus différenciés dans les explants issus de la culture de fragments dorsaux et ventraux de la zone marginale prélevés aux stades 5 et 6

zone marginale s'acquiert progressivement au cours de la segmentation, amorcée au stade 8 (morula âgée) elle s'affirme au stade 9 (jeune blastula). Des travaux ultérieurs (Nakamura et Takasaki, 1970 Nakamura, Takasaki et Mizohata, 1970) limités à l'étude de la ZMD ont révélé que cette capacité débutait plus précocement, dès le stade 7 chez *Triturus pyrrhogaster* et au stade 6b chez le *Xenope*. Dans ces dernières expériences, le fragment de la ZMD n'est pas enveloppé dans un lambeau d'épiderme présomptif.

L'étude que nous avons réalisée à divers stades de la segmentation et de la gastrulation nous a révélé que les c.g.p. n'apparaissent de manière régulière qu'en fin de gastrulation (Tableau 13).

	st. 5	st. 6	st. 8a	st. 10	st. 12	st. 13
Mésenchyme	50	43,7	100	82	100	100
Mésothélium	50	37,5	100	82	100	100
T. Néphr.	5	0	60	0	87,5	51,8
c.g.p.	10	25	5	0	75	62,9

Tableau 13 - Fréquence en % des dérivés formés après culture en "sandwich" de fragments de la zone marginale ventrale et de mésoderme latéral prélevés à divers stades de la segmentation et de la gastrulation.

Cependant les dérivés mésodermiques associés généralement à leur différenciation, mésenchyme et mésothélium, s'observent dès le stade jeune blastula. Le mésoderme latéral présomptif situé initialement dans la zone ventrale de la zone marginale est donc déterminé précocement, seules les c.g.p. semblent nécessiter des interactions complémentaires pour acquérir leur détermination définitive en fin de gastrulation. L'absence de différenciation des cellules sanguines dans nos expériences confirme cette analyse. On peut penser que l'endoderme joue un rôle nécessaire dans ces interactions, aussi fera-t-il l'objet de toute notre attention dans la suite de notre travail.

CHAPITRE II

ORIGINE ET FORMATION DES C.G.P.. RECOMBINAISONS ECTODERME-ENDODERME.

INTRODUCTION

Dès 1936, en associant micromères et cellules vitellines de stade 8, chez *Rana fusca* Vintemberger a mis en évidence une nécessaire interaction entre l'endoderme et l'ectoderme pour l'édification de la corde et des somites. La présence des blastomères végétatifs permettait aux micromères d'exprimer des capacités de développement qu'ils ne pouvaient manifester à l'état isolés. Cet auteur suspectait la présence, dans les cellules vitellines d'un facteur indispensable à la réalisation du "centre organisateur". Plus récemment Ogi (1967, 1969) a obtenu de la différenciation mésodermique en associant des micromères et des macromères d'embryons de Triton aux stades de la segmentation. Nieuwkoop (1969) a montré que chez l'Axolotl, les structures mésodermiques initiales dérivait exclusivement de l'ectoderme présomptif sous l'influence de la masse végétative vitelline. Des expériences plus précises de Boterenbrood et Nieuwkoop (1973) ont révélé que cette capacité inductrice de l'endoderme était régionalisée. L'endoderme dorsal induit préférentiellement de la corde, des myotomes et des tubules néphrétiques alors que l'endoderme ventral provoque surtout la formation des cellules sanguines et des c.g.p.. Cette capacité de l'endoderme à induire des dérivés mésodermiques, maximale au stade blastula, commence à décroître au début de la gastrulation. Des résultats similaires ont été obtenus par Nakamura et al (1971) chez le Xenope et par Asashima (1975) chez *Triturus alpestris*. Considérée sous cet aspect, l'induction des c.g.p. n'a été envisagée que par Boterenbrood et Nieuwkoop (1973) dont les expériences chez l'Axolotl ne se sont guère poursuivies au-delà du stade jeune gastrula. Nous avons repris ce problème chez le Pleurodèle en éprouvant plus spécialement les aptitudes de l'endoderme ventral jusqu'au début de la neurulation. Nous avons réalisé 2 types de combinaisons : des recombinaisons où l'ectoderme et l'endoderme sont associés de manière permanente pendant toute la durée de la culture et des recombinaisons où les 2 feuillets sont associés temporairement. Les résultats obtenus avec l'endoderme dorsal nous ont incités à étudier le rôle éventuel de la chorde sur la différenciation des c.g.p.

1 - Recombinaison permanente

1-1. Protocole opératoire.

De l'ectoderme de blastula âgée (st. 7) est associé en culture *in vitro* avec de l'endoderme ventral ou dorsal prélevé sur des germes de stades 6 à 13/14 comme l'indique la figure 8. Afin de repérer avec soin la polarité dorso-ventrale des blastulas de stades 6 et 7, nous avons procédé à la pose de marques colorées sur des germes présentant au stade 2 blastomères, une zone dépigmentée bien marquée. Nous avons vu, dans le chapitre I, que cette zone correspondait, dans la majorité des cas, à la future face dorsale de l'embryon. Chaque secteur endodermique, dorsal ou ventral, est ainsi découpé puis réassocié avec un fragment d'épiderme présomptif issu de l'hémisphère animal. L'épiderme adhère ainsi à l'endoderme et le recouvre rapidement. Les recombinaisons sont mises en culture selon la méthode habituelle et fixées au bout de 15 jours de culture.

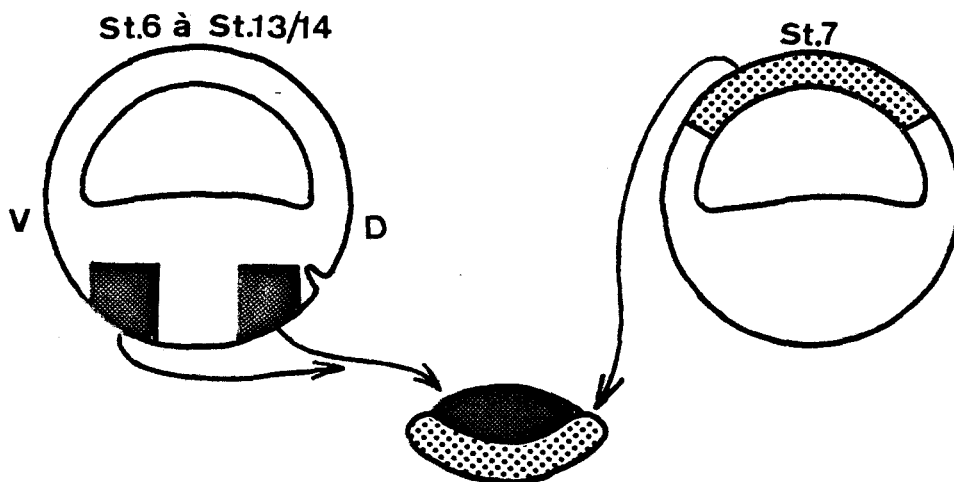


Fig. 8 : Association d'ectoderme de blastula âgée avec de l'endoderme dorsal ou ventral de divers stades.

1-2. Résultats

Les observations faites sur les coupes histologiques des diverses recombinaisons ont fait l'objet de nombreux tableaux de résultats. Seuls, ceux relatifs à l'endoderme ventral de stades 7 et

Numéro de l'expérience	Chorde	Str. Neu.	Myo.	T. Néphr.	Mésen.	Mésoth.	c.g.p.
1	-	-	-	-	+	+	55
2	-	-	-	-	+	+	50
3	-	-	+	+	+	+	27
4	-	-	-	-	+	+	105
5	-	-	-	+	+	+	15
6	-	-	-	+	+	+	38
7	-	-	-	-	+	+	52
8	-	-	-	+	+	+	0
9	-	-	-	-	+	+	0
10	-	-	+	-	+	+	18
11	-	-	-	-	+	+	30
12	-	-	-	-	+	+	7
13	-	-	-	+	+	+	0
Total	0	0	2	5	13	13	10
(%)	(0)	(0)	(15)	(38)	(100)	(100)	(77)
							$m=30,54$ $\pm 28,82$

Tableau 14 - Différenciations obtenues après recombinaison d'ectoderme et d'endoderme de stade 7. (-) Absence
(+) Présence
(%) Fréquence

Numéro de l'expérience	Chorde	Str. Neu.	Myo.	T. Néphr.	Mésen.	Mésoth.	c.g.p.
1	-	-	+	+	+	+	160
2	-	-	-	+	+	+	110
3	-	-	-	-	+	+	80
4	-	-	+	+	+	+	160
5	-	-	-	+	+	+	73
6	-	-	-	-	+	+	54
7	-	-	-	+	+	+	107
8	-	-	+	+	+	+	89
9	-	-	-	-	+	+	27
10	-	-	-	+	+	+	38
11	-	-	-	-	+	+	41
12	-	-	-	-	+	+	47
13	-	-	+	+	+	+	141
14	-	-	-	-	+	+	21
15	-	-	-	-	+	+	28
16	-	-	+	-	+	+	48
17	-	-	-	+	+	+	154
18	-	-	-	-	+	+	107
19	-	-	-	+	+	+	19
20	-	-	+	+	+	+	0
21	-	-	+	+	+	+	164
22	-	-	-	+	+	+	39
Total	0	0	7	13	22	22	21
(%)	(0)	(0)	(32)	(59)	(100)	(100)	(95)
							$m=77,59$ $\pm 51,47$

Tableau 15 - Différenciations obtenues après recombinaison d'ectoderme et d'endoderme de stade 8a. (-) Absence
(+) Présence
(%) Fréquence

8a sont rapportés ici (Tableaux 14 et 15). L'ensemble de ces résultats est résumé dans le tableau 16. L'association d'endoderme prélevé au stade 5 (jeune blastula) a été tentée mais les blastomères volumineux et peu nombreux ne se prêtent pas à la culture. L'épiderme ne peut recouvrir les cellules endodermiques qui se dissocient, nous n'avons pu tester les capacités inductrices de cet endoderme.

Série expérimentale	Nombre de cas	Chorde	Str. Neur.	Myo.	T. Néphr.	Mésén.	Méso.	c.g.p.
Endoderme Ventral								
série 1 (st. 6)	29	0	0	0	20	48	45	14
série 2 (st. 7)	13	0	0	15	38	100	100	77
série 3 (st. 8a)	22	0	0	32	59	100	100	95
série 4 (st. 9)	16	0	0	0	0	87	62	44
série 5 (st. 10/11)	15	0	0	0	13	67	20	33
série 6 (st. 13/14)	12	0	0	0	0	42	0	0
Endoderme Dorsal								
série 7 (st. 7)	20	80	100	90	70	100	100	5
série 8 (st. 8a)	14	100	100	100	90	100	100	0
Endoderme Ventral 8a + Chordo-mésoderme 8a								
série 9	18	100	100	100	50	100	100	0

Tableau 16 - Fréquence des structures obtenues en fonction de l'âge et de la nature de l'endoderme associé à l'ectoderme de stade 7.



1-2-1. Recombinaisons d'endoderme ventral.

Les fragments ectodermiques cultivés seuls pendant 15 jours ne présentent aucune différenciation mésodermique. La plupart se dissocient en cours de culture ou évoluent en épiderme

atypique. Les secteurs endodermiques de leur côté ne présentent aucune évolution, ils restent indifférenciés. Une grande partie des cellules se désagrègent dans le milieu de culture.

Les prestations issues de la recombinaison d'ectoderme et d'endoderme ventral se différencient, en règle générale, en vésicules transparentes, plus ou moins pigmentées, laissant apparaître une cavité et des travées mésenchymateuses. Ces vésicules ne semblent pas organisées et aucun axe de symétrie n'est apparent.

- Série 1 : Endoderme ventral de stade 6.

L'examen histologique révèle que les vésicules sont limitées par un épithélium épidermique tapissé dans la moitié des cas par du mésenchyme, une cavité coelomique occupe le centre. Quelques tubules néphrétiques sont parfois observés (20% des cas). Les c.g.p. sont peu fréquentes, 4 cas sur 29 et en petit nombre (respectivement 4, 14, 6 et 28 cellules). Elles apparaissent groupées en îlots au sein du mésenchyme. La chorde, les myotomes et les cellules sanguines font toujours défaut. En général, l'endoderme forme des amas de cellules indifférenciées en voie de dégénérescence.

- Série 2 : Endoderme ventral de stade 7 (Tableau 14).

Par rapport à la série précédente, le pourcentage de dérivés mésodermiques induits accuse une progression importante. Mésenchyme et mésothélium se rencontrent dans tous les cas, tubules néphrétiques et myotomes sont plus rares. Un nombre important de prestations (77%) renferment des c.g.p. en nombre variable, les écarts sont considérables ($m = 30,54 \pm 28,82$). Ces cellules se regroupent en îlots au voisinage d'un tubule néphrétique ou occupent une travée mésenchymateuse (Planche V. Fig. C, D, E et F).

- Série 3 : Endoderme ventral de stade 8a (Tableau 15)

C'est la série expérimentale qui renferme les pourcentages les plus élevés en dérivés mésodermiques variés. En particulier, 95% des cas étudiés présentent des c.g.p. en nombre parfois important (fréquemment la centaine), les variations numériques sont toujours élevées ($m = 77,59 \pm 51,47$).

- Série 4 : Endoderme ventral de st. 9.

La fréquence des dérivés mésodermiques induits accuse une régression importante, qui affecte notamment les myotomes et les tubules néphrétiques qui n'apparaissent plus. Corrélativement, les c.g.p. suivent la même évolution, elles ne sont observées que dans 44% des cas.

- Série 5 : Endoderme ventral de st. 10/11.

Les fréquences des structures mésodermiques induites continuent de baisser. Les c.g.p. ne sont plus décelées que dans 33% des cas.

- Série 6 : Endoderme ventral de st. 13/14.

Cette série expérimentale, réalisée avec de l'endoderme de jeune neurula, se caractérise par l'absence de structures mésodermiques typiques. Seul le mésenchyme, en quantité relativement faible, persiste dans 42% des cas. Les c.g.p., elles aussi, sont totalement absentes.

1-2-2. Recombinaisons d'endoderme dorsal (séries 7 et 8)

Les recombinaisons réalisées avec de l'endoderme dorsal prélevé aux stades 7 et 8a évoluent dans la majorité des cas en vésicules dotées d'une symétrie bilatérale apparente. Elles sont affectées par des mouvements musculaires spontanés et dans quelques cas, nous avons observé un tube cardiaque fonctionnel. L'étude histologique confirme nos observations macroscopiques et souligne le haut degré d'organisation des prestations. On constate une fréquence élevée de dérivés mésodermiques comprenant une corde flanquée de 2 rangées de myotomes bien développés (Planche V. Fig. A et B). Dans tous les cas, un tube neural se différencie en position dorsale tandis que ventralement, l'endoderme évolue parfois en un tube digestif plus ou moins typique. Des tubules néphrétiques, du mésenchyme et un épithélium coelomique sont fréquemment observés (Planche V. Fig. A). Les structures induites accusent au travers de leurs relations topographiques une polarité dorso-ventrale et crânio-caudale comparable à celle que l'on trouve chez un embryon normal. Les c.g.p., en nombre d'ailleurs limité, n'ont été retrouvées que dans un seul cas de la série 7 où de surcroît, la corde fait défaut. Cette incompatibilité apparente entre c.g.p. et corde pouvait laisser supposer un rôle inhibiteur de cette dernière sur la différenciation des c.g.p. Ceci nous a conduit à réaliser des recombinaisons d'ectoderme et d'endoderme ventral en y ajoutant un fragment de chordo-mésoderme prélevé au stade 8a.

1-2-3. Recombinaisons d'endoderme ventral et de chordo-mésoderme (Série 9).

L'endoderme ventral et le chordo-mésoderme sont prélevés sur de jeunes gastrulas de stade 8a (Fig. 9).

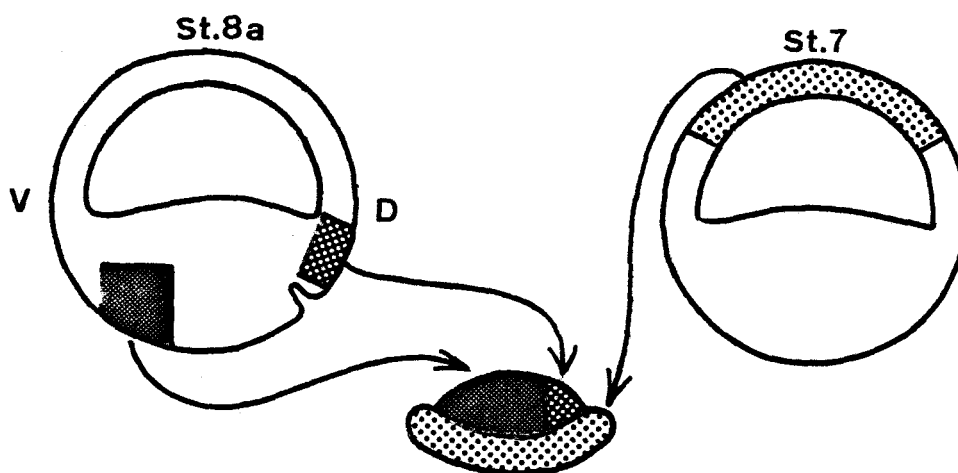


Fig. 9 : Association d'ectoderme de blastula âgée avec de l'endoderme ventral et du chordo-mésoderme prélevés au stade 8.

Les recombinaisons donnent naissance à des prestations qui présentent une organisation dorso-ventrale très apparente comparable à celle décrite dans les séries 7 et 8 (Planche VI. Fig. E et F). On peut détailler un niveau dorsal riche en dérivés mésodermiques dorsaux (chorde et myotomes) et en structures neurales céphaliques et un niveau ventral occupé par seulement par du mésenchyme et des lames latérales (Planche VI. Fig. F). On remarque que les fréquences d'apparition de ces dérivés mésodermiques sont proches ou identiques de celles observées dans la série 8 (Tableau 16). Comme dans cette expérience où l'endoderme dorsal est associé à l'ectoderme, les c.g.p. ne sont jamais décelées.

1-3. Conclusion.

La recombinaison *in vitro* d'ectoderme et d'endoderme de Pleurodèle, à différentes étapes du développement embryonnaire, provoque l'induction et la différenciation des principaux dérivés de type mésodermique. Cette capacité inductrice de l'endoderme est régionalisée dès la fin de la segmentation. L'endoderme d'origine dorsale induit des structures mésodermiques de type axial comme la corde et de type dorsal comme les somites. La nature et l'organisation des prestations obtenues les rendent comparables à celle d'un embryon normal. Dans ce type d'association, les c.g.p. n'apparaissent qu'exceptionnellement (1 cas sur 34, encore faut-il signaler que dans ce cas particulier, la corde est absente).

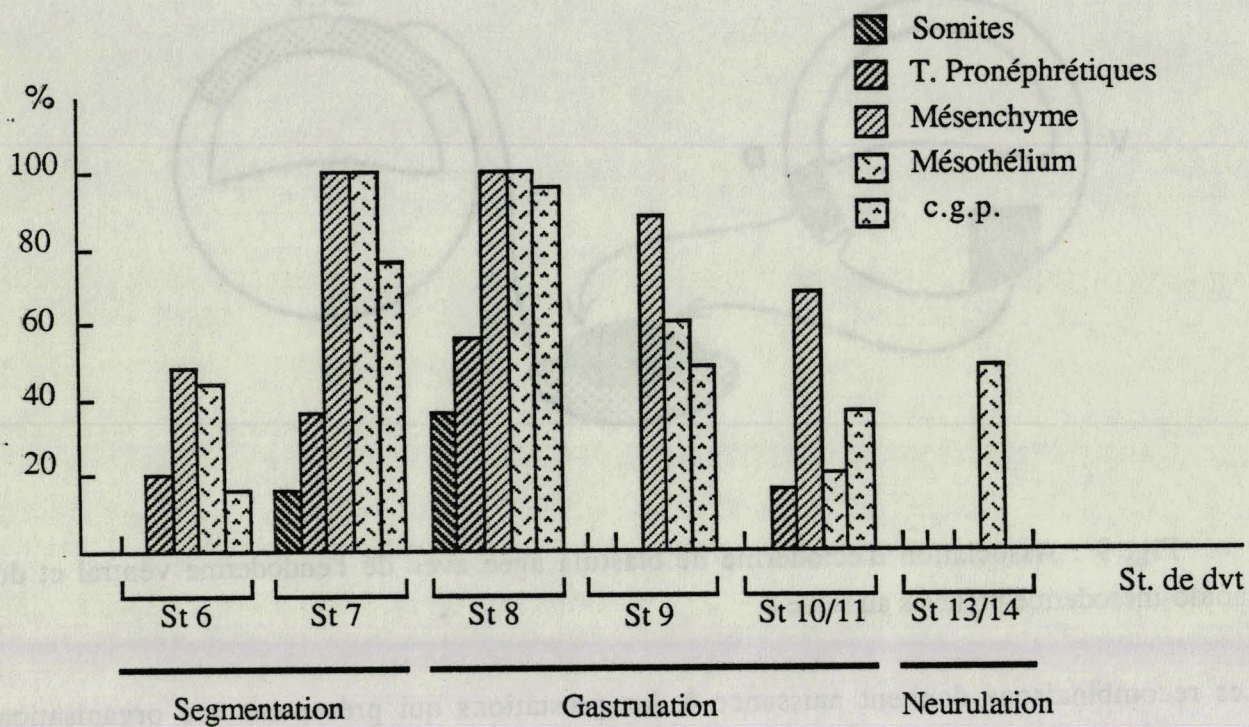


Fig. 10 : Fréquences des structures mésodermiques induites après recombinaisons d'endoderme ventral prélevé à divers stades du développement (st. 6 à 13/14) avec de l'épiderme présomptif de stade 7.



L'endoderme provenant de la région ventrale manifeste des aptitudes inductrices différentes se caractérisant par la formation de structures mésodermiques de type ventral avec différenciation de mésenchyme et épithélium coelomique. A ces structures sont associées, d'une manière générale, des c.g.p. en quantité importante et groupées en îlots. Les tubules néphrétiques apparaissent dans les 2 types d'association. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Boterenbrood et Nieuwkoop (1973) chez l'Axolotl. Ces auteurs ont décrit 2 types de différenciation mésodermique :

- un type dorsal, avec chorde accompagnée de moelle épinière et parfois de cerveau postérieur, 2 rangées de myotomes. La présence en petit nombre de c.g.p. dans quelques cas et l'absence de cellules sanguines.

- un type ventral, caractérisé par l'absence de chorde et de myotomes organisés, des cellules sanguines en quantité variable et des c.g.p. en grand nombre.

Nous confirmons chez le Pleurodèle la régionalisation précoce de l'endoderme, dès le stade 6 (Blastula moyenne). Sur 2 points, cependant, nos résultats diffèrent sensiblement de ceux rapportés chez l'Axolotl, l'absence de toute différenciation de cellules sanguines dans les recombinaisons de type ventral et l'absence de différenciation de c.g.p. en présence de chorde dans les associations de type dorsal. Chez le Pleurodèle, en aucun cas, chorde et c.g.p. ne se différencient conjointement ; Boterenbrood et Nieuwkoop (1973), Sutasurya et Nieuwkoop (1974) sont moins affirmatifs, ils estiment que l'endoderme dorsal aurait une certaine aptitude à induire des c.g.p. Les espèces animales utilisées, différentes, la localisation précise et l'étendue du secteur endodermique dorsal prélevé, peuvent expliquer, peut-être, cette apparente contradiction. Dans nos expériences, le chordo-mésoderme semble jouer un rôle inhibiteur de la différenciation des c.g.p., l'apport de chordo-mésoderme présomptif dans la recombinaison ectoderme-endoderme ventral empêche la formation des c.g.p. qui sont normalement induites par l'endoderme ventral. Nos résultats démontrent que la capacité inductrice de l'endoderme ventral varie selon l'âge de l'explant endodermique. La figure 10 illustre cette évolution.

La variété et la fréquence des dérivés mésodermiques induits augmentent progressivement pendant la segmentation, atteignent leur maximum au début de la gastrulation puis déclinent régulièrement pour disparaître en début de neurulation. Les c.g.p., qui sont toujours associées aux dérivés mésodermiques de type ventral, suivent la même évolution. Boterenbrood et Nieukoop (1973) ont montré chez l'Axolotl que le maximum de c.g.p. induites se situait aux stades blastula âgée et jeune gastrula, l'analyse n'ayant pas été poursuivie au-delà. Leurs expériences révèlent en outre, que la capacité inductrice de l'endoderme commence à diminuer au niveau dorsal au stade 9 (Blastula âgée) puis s'étend à la région ventrale au stade 10⁻ (très jeune gastrula). D'autres travaux confirment cette évolution, chez le Xénope, Nakamura et al (1971) constatent une régression progressive de la capacité inductrice depuis le stade morula jusqu'au stade jeune gastrula où elle

disparaît. Asashima (1975) étend cette étude dès le stade oeuf insegmenté jusqu'à la jeune larve du Triton alpestre. Par la méthode des sandwichs, il teste les aptitudes inductrices de portions variées d'endoderme, il conclue que l'endoderme de blastula possède l'activité la plus intense.

Nous n'avons pas étudié la compétence de l'ectoderme chez le Pleurodèle, dans nos expériences celui-ci a toujours été prélevé au stade blastula âgée (st. 7). Des travaux rapportés par Sudarwati (1973) chez le Xénope montrent que l'ectoderme est déjà compétent pour former des structures mésodermiques au stade jeune blastula et que cette compétence commence à décroître en fin de gastrulation. Dans nos expériences, nous avons ainsi isolé de l'ectoderme doté d'une compétence maximale pour différencier des structures mésodermiques variées. En conclusion, chez le Pleurodèle, les c.g.p. n'apparaissent qu'en présence d'endoderme ventral, lorsque des dérivés mésodermiques de type ventral sont induits, les c.g.p. doivent être considérées comme un élément caractéristique de la différenciation de ces structures. Ce point étant acquis, nous avons essayé de préciser les mécanismes impliqués dans ces interactions de type inducteur et en particulier, nous avons recherché qu'elle était la durée de contact nécessaire à la formation des c.g.p. et des dérivés mésodermiques associés.

2 - Recombinaison temporaire

2-1. Protocole opératoire.

De l'ectoderme de blastula âgée (st. 7) est associé en culture avec de l'endoderme ventral prélevé sur de jeunes gastrulas (st. 8a). Nous avons choisi ce stade particulier car nos résultats antérieurs ont montré que l'endoderme ventral y manifeste ses capacités inductrices maximales, en particulier 95% des recombinaisons réalisées possèdent des c.g.p. en quantité importante. Après une durée variant de 4 à 72 h, les 2 feuillets sont séparés, mécaniquement, à l'aide des instruments en fil de platine. L'endoderme est soigneusement extirpé de l'ectoderme qui le recouvre plus ou moins. L'ectoderme, ainsi traité, est maintenu en culture pendant 15 jours dans le milieu de Holtfreter. Les cultures sont ensuite fixées et analysées dans les conditions habituelles.

2-2. Résultats.

Nous avons vu précédemment que l'ectoderme isolé et cultivé seul a tendance à se dissocier en cours de culture. Dans quelques cas, il peut former des vésicules plus ou moins volumineuses. L'examen histologique montre que ces vésicules sont dépourvues de toute structure mésodermique, seul un épiderme atypique limite ces prestations.

Les résultats des associations temporaires entre l'ectoderme et l'endoderme ventral sont résumés dans le tableau 17.

Durée de contact	Différenciations de l'ectoderme				
	Mésenchyme n (%)	Mésothélium n (%)	Tubules néphrétiques n (%)	c.g.p. n (%)	Total Expériences
4, 6 et 8 h.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	24
16 h	15 (88)	15 (88)	8 (47)	3 (17)	17
24 h	38 (90)	31 (74)	16 (38)	3 (7)	42
48 h	43 (81)	31 (58)	20 (38)	5 (9)	53
72 h	8 (53)	8 (53)	1 (7)	4 (27)	15
15 jours	22 (100)	22 (100)	13 (59)	21 (95)	22

Tableau 17 - Fréquence des tissus différenciés par l'ectoderme après des contacts de durée variable avec l'endoderme ventral.



- Contact limité à 4, 6 et 8 heures.

Les explants mis au contact de l'endoderme ventral pendant ces courtes périodes évoluent dans la majorité des cas en vésicules épidermiques. Les structures mésodermiques et les c.g.p. n'apparaissent jamais.

- Contact limité à 16 heures.

La différenciation des explants ainsi traités marque une nette évolution. 88% des vésicules sont limitées par un épiderme doublé d'un épithélium coelomique épaissi par du mésenchyme (Planche VI. Fig. A, B, C et D). Du tissu neuroïde et des mélanophores sont fréquemment observés contre l'épiderme. Fait remarquable, nous avons mis en évidence des c.g.p. dans 3 cas, leur nombre est peu élevé (respectivement 14, 16 et 2). Ces cellules sont associées aux dérivés mésodermiques, groupées en petits îlots au sein du mésenchyme (Planche VI. Fig. A, B, C et D). Des cellules sanguines n'ont pu être identifiées avec certitude.

- Contact limité à 24 heures.

Les résultats obtenus sont comparables à ceux décrits dans la série précédente. La prolongation du contact entre les 2 feuillets n'améliore pas les fréquences des tissus différenciés par l'ectoderme. En particulier, nous n'avons décelé de c.g.p. que dans 3 cas sur 42.

-Contact limité à 48 heures.

La nature des structures induites reste similaire à celles décrites antérieurement. Les c.g.p. n'apparaissent que dans 9% des cas, toujours en petit nombre.

- Contact étendu à 72 heures.

Au-delà de 48 heures, il devient très difficile d'extraire le fragment endodermique, celui-ci étant pratiquement recouvert par l'ectoderme. Néanmoins, dans 15 cas, nous avons réussi à séparer les 2 feuillets correctement après 72 heures d'association. Les résultats indiquent une baisse de la fréquence des dérivés mésodermiques induits, seule exception, les c.g.p. qui se différencient dans 27% des cas.

2-3. Conclusion.

Ces expériences confirment le rôle inducteur de l'endoderme dans la formation du mésoderme et des c.g.p. Les c.g.p. constituent un élément caractéristique de la différenciation du mésoderme ventral. Nous confirmons l'origine exclusivement ectodermique de ces cellules. La comparaison des résultats, rassemblés dans le tableau 17, montre qu'un temps de contact compris entre 8 h et 16 h est nécessaire pour que les interactions entre l'endoderme ventral et l'ectoderme conduisent à la formation des dérivés mésodermiques et des c.g.p.. Loin de favoriser la différenciation, la prolongation du contact jusqu'à 72 h s'accompagne d'une diminution de la fréquence des structures mésodermiques obtenues. Ceci s'explique par le fait que l'extirpation de l'endoderme est d'autant plus traumatisante qu'elle est pratiquée tardivement, elle ne peut se faire sans léser plus ou moins l'ectoderme qui entoure totalement la masse vitelline interne. Par rapport à l'association permanente des 2 tissus pendant 15 jours de culture, la séparation occasionne une chute du nombre et de la quantité des structures induites.

La fréquence des c.g.p. en particulier passe de 95% à 17% des cas. Outre les lésions provoquées par l'intervention et évoquées précédemment, les conditions de culture peuvent expliquer ces différences. Il est connu qu'un explant ectodermique de petite taille, cultivé seul, a tendance à se dissocier et que l'adjonction d'endoderme, riche en vitellus, est un facteur favorisant. La présence d'éléments neuroïdes dans les cultures d'ectoderme isolé après contact avec l'endoderme est un argument en faveur de cette explication. En utilisant un facteur végétalisant, protéine extraite d'embryons de poulet, comme agent inducteur, Kocher-Becker et Tiedemann (1971) ont obtenu des c.g.p. à partir d'ectoderme de Triton. Dans ces conditions de culture, comparables aux nôtres,

les c.g.p. n'ont été obtenues que dans 11 cas sur 125. La durée de contact, comprise entre 8 et 16 h, nécessaire à la formation des structures mésodermiques et des c.g.p. correspond parfaitement à la phase d'activité inductrice de l'endoderme ventral. Nous avons montré en effet, dans le paragraphe précédent, que l'aptitude inductrice de l'endoderme ventral est maximale au début de la gastrulation, stade où est prélevé l'endoderme dans nos expériences. Elle décroît ensuite progressivement pour disparaître en fin de gastrulation soit 24 h plus tard. Les travaux consacrés au temps minimal nécessaire à la transmission du stimulus inducteur font apparaître une grande diversité de résultats en fonction des structures organotypiques induites et des espèces considérées. Dans le cas de l'induction neurale, le temps de traitement de l'ectoderme par les inducteurs hétérogènes conditionne la nature des formations nerveuses différenciées (Revue par Saxen et Toivonen, 1962). Par ailleurs, 5 minutes de contact suffisent pour acquérir du cerveau antérieur à partir d'ectoderme de *Triturus*, alors que 4 heures sont nécessaires chez *Ambystoma* (Johnen, 1956). Chez le Pleurodèle, Duprat et al (1982) obtiennent 100% d'induction neurale quand l'ectoderme est associé à la lèvre dorsale du blastopore pendant 6 heures. L'ectoderme de gastrula de Triton, traité par le facteur végétalisant, extrait d'embryons de poulet, différencie soit des cellules sanguines et du pronéphros (2-4 h de traitement) soit de la chorde et des somites (4-8 h) ou se transforme en endoderme (8-24 h), (Minuth et Grunz, 1980).

CHAPITRE III

MECANISMES INTERVENANT DANS L'INDUCTION DES C.G.P.

INTRODUCTION

Les expériences que nous venons de décrire montrent clairement qu'un processus de type inducteur est nécessaire pour que des c.g.p. associées à des dérivés mésodermiques puissent se différencier au sein de l'ectoderme compétent. On peut s'interroger sur la nature et le mode de transmission des informations circulant entre les cellules vitellines inductrices et les cellules cibles ectodermiques. Si l'on consulte la bibliographie relative à l'induction embryonnaire, on constate que la plupart des travaux ont été consacrés à l'étude de l'induction primaire. Les premiers efforts ont été orientés vers l'identification de composés inducteurs actifs. Cette phase biochimique a permis d'isoler et de caractériser certaines substances actives morphogénétiquement. Nous laisserons de côté volontairement tout ce qui touche à la découverte de nombreux facteurs neuralisants pour nous limiter à la mise en évidence de facteurs mésodermisants.

Toivonen (1953) découvre les qualités inductrices mésodermiques de la moelle osseuse de Cobaye (induction de chorde, muscle et tubules pronéphrétiques). Yamada (1961) étudiant les propriétés de cet inducteur hétérogène isole un facteur actif de nature protéique. Tiedemann et Tiedemann (1959) isolent un facteur similaire à partir d'extraits d'embryons de Poulet de 9 jours. Ce facteur de nature protéique, purifié (Poids Moléculaire 28000 à 30000 daltons) est capable d'endodermiser et de mésodermiser l'ectoderme de gastrula de Triton. C'est ce facteur qualifié de végétalisant qui, associé à de l'ectoderme, permettra à Kocher -Becker et Tiedemann (1971) d'obtenir l'induction de quelques c.g.p. isolées au sein de dérivés mésodermiques. Masui (1961) et Ogi (1961) démontrent les premiers que l'ectoderme peut être mésodermisé après un traitement au lithium. Plus récemment, Kawakami (1976) décrit les capacités inductrices mésodermiques d'un autre inducteur hétérogène, extrait de la vessie natatoire de Carpe. Le mode d'action de ces facteurs n'est pas clair et il est improbable qu'ils soient impliqués dans le développement normal. D'autres travaux, plus prometteurs à nos yeux, ont été réalisés en vue de rechercher des facteurs actifs à partir de l'embryon lui-même. Signalons en particulier les études biochimiques publiées par Deuchar (1967) et Faulhaber (1970, 1972). Ces auteurs ont réussi à isoler des fractions actives à partir d'embryons entiers à différents stades du développement. Ces fractions actives, en l'occurrence des protéines et des nucléoprotéines induisent en majorité des structures neurales.

L'étude biochimique de l'induction se poursuit actuellement avec l'école de Tiedemann mais les derniers résultats publiés ne concernent que l'isolement de fractions inductrices neuralisantes à partir d'embryons de Xénope (Janeczek, John, Born, Tiedemann et Tiedemann (1984). En conclusion, le seul facteur mésodermisant, extrait et purifié, est le facteur végétalisant isolé de l'embryon de Poulet. L'existence de facteurs diffusibles responsables de l'induction mésodermique à l'intérieur même de l'embryon reste à démontrer.

En ce qui concerne la transmission du signal inducteur, nous ne disposons pas encore de résultats cohérents et satisfaisants. Des mécanismes variés ont été proposés pour expliquer la transmission de signaux inducteurs entre cellules embryonnaires. Selon Saxen et Lehtonen (1978), il est commode de distinguer 2 types principaux de transmission :

- un premier type qualifié de "long range" dans lequel il y a transmission de substances par diffusion à grande distance.
- un second type qualifié de "short range" dans lequel les interactions cellulaires nécessitent des contacts cellulaires étroits, de cellule à cellule.

Dans le but de rechercher le mécanisme de transmission du signal inducteur entre l'endoderme ventral et l'ectoderme compétent, nous avons utilisé la méthode de culture de tissu avec interposition de filtre. Cette technique imaginée par Grobstein dès 1953 pour son étude de la différenciation de la glande salivaire a subi depuis quelques améliorations et a été utilisée à de nombreuses reprises.

Citons l'étude de l'induction neurale primaire chez les Amphibiens (Toivonen et al, 1975 ; Toivonen et Wartiovaara, 1976 ; Toivonen, Tarin et Saxen, 1976 ; Toivonen, 1979) ; la chondrogenèse du bourgeon du membre d'oiseau (Gumpel-Pinot, 1980, 1981) ; l'induction de la cornée (Karkinen - Jääskeläinen, 1978) ; le développement de la cornée (Hay et Meier, 1976) ; la morphogenèse de la dent de souris (Thesleff et al, 1977) ; la mésodermisation de l'ectoderme de la gastrula d'Amphibien (Minuth, 1978) ; la formation des tubules rénaux (Wartiovaara, Nordling, Lehtonen et Saxen, 1974) ; Saxen et al, 1976, 1978) ; la différenciation chondrogénique des cellules de crêtes neurales (Smith et Thorogood, 1983) ; la végétalisation de l'ectoderme de Triton (Kawakami, Sasaki, Sato et Osako, 1978). Tout récemment, Grunz et Tacke (1986) ont publié une étude de la capacité inductrice de l'endoderme du Xénope.

Dans tous ces travaux, le tissu inducteur et les cellules cibles sont séparées *in vitro* par une membrane filtrante de porosité connue. Les tissus placés de part et d'autre de la membrane sont capables d'émettre des prolongements cellulaires qui peuvent traverser le filtre si le diamètre des pores est suffisant. Il sera donc possible de préciser, en fonction de la réponse du tissu cible, s'il y a ou non contact de cellule à cellule.

L'examen des pores du filtre en microscopie électronique permet l'observation d'éventuels

filopodes. Cette méthode d'interposition de filtre, qui s'est révélée précieuse dans l'analyse de nombreux types d'interactions cellulaires embryonnaires, nous a semblé bien adaptée à l'étude de notre modèle d'interactions entre l'ectoderme et l'endoderme.

1 - Culture transfiltre

1-1. Interposition de filtre normal

1-1-1. Protocole expérimental

La technique que nous avons utilisée est inspirée de Saxen (1961) qui l'a mise au point lors de ses travaux sur l'induction primaire. Le dispositif choisi est représenté sur la figure 11

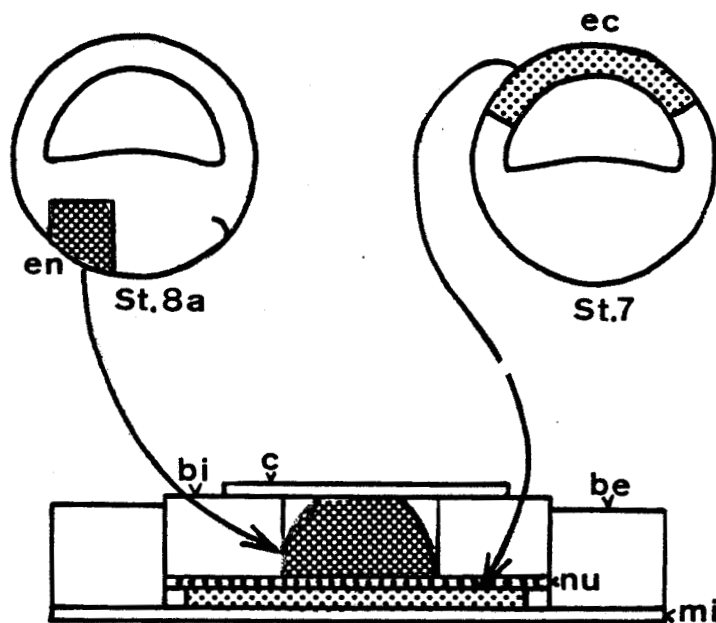


Fig. 11 : Technique de culture transfiltre utilisée pour étudier les interactions tissulaires : l'ectoderme (ec) et l'endoderme ventral (en) sont prélevés sur des germes de stades 7 et 8a. Le matériel végétatif est placé contre le filtre Nucléopore (nu) dans la chambre de culture délimitée par la bague interne de Téflon (bi). L'ectoderme repose sur le filtre Millipore (mi) scellé à la bague externe de Téflon (be). Un cavalier (c) de verre est posé contre l'endoderme.

2 types de bagues sont découpées dans des tubes de Téflon, les plus petites possèdent un diamètre externe de 1,55 mm et un diamètre interne de 0,98 mm alors que les plus grandes ont un diamètre externe de 3 mm et un diamètre interne de 1,6 mm. Ces bagues scellées à des fragments de filtre Millipore ou Nucléopore constitueront de petites chambres de culture où seront placés les tissus ectodermique et endodermique. L'anneau le plus grand est soudé à une pastille de filtre Millipore de 150 μm d'épaisseur alors que l'autre anneau, plus petit, est scellé à une autre pastille de filtre Nucléopore. Nous avons sélectionné 4 types de filtres Nucléopore dont voici les caractéristiques :

- pores 0,05 μm , épaisseur 5 μm , densité des pores $6 \times 10^8/\text{cm}^2$
- pores 0,2 μm , épaisseur 10 μm , " " $3 \times 10^8/\text{cm}^2$
- pores 1 μm , épaisseur 10 μm , " " $2 \times 10^7/\text{cm}^2$
- pores 8 μm , épaisseur 10 μm , " " $1 \times 10^5/\text{cm}^2$

Les disques découpés dans les filtres à l'aide de ciseaux de Pascheff- Wolff sont accolés aux anneaux de Téflon à l'aide d'une résine acrylique, le Nobécutane. Les chambres de culture sont stérilisées 10 minutes dans l'alcool 70°, elles sont ensuite rincées dans 2 bains successifs de milieu opératoire de Holtfreter stérile. L'ectoderme présumé prélevé au stade 7 est déposé dans la bague la plus grande, face externe contre le filtre Millipore. La seconde bague est immédiatement placée à l'intérieur de la première pour empêcher l'enroulement du fragment ectodermique. L'endoderme ventral isolé au stade 8a est ensuite déposé dans la petite chambre contre le filtre Nucléopore. Un cavalier de verre est appliqué sur l'endoderme pour assurer un contact rapide et durable des tissus placés de part et d'autre du filtre Nucléopore. Les associations ainsi réalisées sont cultivées 15 jours dans le milieu de Holtfreter, à l'issue desquels les explants sont examinés selon la méthode habituelle.

1-1-2. Résultats

Nous avons réalisé de nombreuses cultures d'ectoderme seul, à titre de contrôle. Après 15 jours de culture, les explants ectodermiques ont évolué en majorité en épiderme atypique, dans certains cas ils se sont dissociés. L'examen histologique n'a jamais révélé la présence de dérivés mésodermiques.

4 séries de 24 cultures transfiltre correspondant aux 4 types de filtres Nucléopore décrits antérieurement ont été réalisées. Dans tous les cas, le fragment ectodermique s'est comporté comme

Série opératoire	Diamètre de l'orifice pratiqué dans le filtre $x \pm 50 \mu\text{m}$	Nombre d'expériences	Ectoderme indifférencié	Différenciations obtenues			
				Mésen.	Mésoth.	c.g.p.	
Filtre $0,2 \mu\text{m}$	$150 \mu\text{m}$	1	1				
	$250 \mu\text{m}$	2	2				
	$300 \mu\text{m}$	9	7	2		1	(7)
	$350 \mu\text{m}$	2	2				
	$400 \mu\text{m}$	2	2				
Filtre $1 \mu\text{m}$	$200 \mu\text{m}$	4	4				
	$250 \mu\text{m}$	1	1				
	$300 \mu\text{m}$	6	2	4	2	1	(4)
	$350 \mu\text{m}$	6	1	5	5	1	(26)
	$400 \mu\text{m}$	4	1	3	1		
	$500 \mu\text{m}$	1		1	1	1	(11)
Total		38	23	15	9	4	

Tableau 18 - Différenciations obtenues après culture transfiltre d'ectoderme associé à de l'endoderme ventral, le filtre interposé entre les 2 tissus est percé d'un orifice dont le diamètre varie de $150 \mu\text{m}$ à $500 \mu\text{m}$. Le chiffre () indique le nombre de c.g.p. décelées dans l'explant ectodermique.



dans les contrôles, aucun dérivé mésodermique, aucune c.g.p. ne se sont différenciés. Le tissu inducteur, l'endoderme ventral, ne présente aucun signe de différenciation. Ces résultats semblent indiquer que le filtre constitue une barrière empêchant le passage du signal inducteur émis par l'endoderme ; quelque soit le type de filtre utilisé, la réponse est identique. Dans ces conditions expérimentales, le message inducteur ne peut se transmettre à distance, on peut retenir la nécessité d'une transmission par contact direct de tissu à tissu. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des cultures transfiltre à l'aide de filtres modifiés.

1-2. Interposition de filtre percé

1-2-1. Protocole opératoire

La méthode de culture transfiltre est modifiée en perçant une ouverture au centre du filtre Nucléopore à l'aide d'une aiguille rougie à la flamme. Les dimensions précises de la zone de contact ainsi établie entre les 2 feuillets sont mesurées ultérieurement lors de l'examen histologique. Nous n'avons utilisé que des filtres Nucléopore de porosité 0,2 μm et 1 μm , les résultats précédents ayant montré que la densité des pores ainsi que leur diamètre n'avaient aucune incidence sur la transmission du signal inducteur.

1-2-2. Résultats

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 18. La lecture de ce tableau fait apparaître en premier lieu la différenciation de dérivés mésodermiques dans 15 cas sur 38. Ces dérivés sont essentiellement composés de mésenchyme (15 cas) souvent accompagné de mésothélium (9 cas). Les figures A et B de la Planche VII illustrent l'évolution des tissus situés de part et d'autre du filtre percé. L'ectoderme envahit l'orifice pratiqué dans le filtre Nucléopore ; arrivé au contact de la masse vitelline, il donne naissance à une vésicule parfois volumineuse, à paroi épidermique. Au voisinage de l'endoderme se différencient du mésenchyme et des lames mésothéliales. L'ectoderme éloigné de la zone de contact entre les 2 feuillets reste indifférencié. Le tableau 18 montre que les dérivés mésodermiques ne se forment que si la zone de contact entre le tissu inducteur et le tissu cible atteint au moins 300 μm . Des c.g.p. ont été décelées dans 4 cas, peu nombreuses (respectivement 7, 11, 4 et 26 cellules) elles sont toujours associées aux dérivés mésodermiques (Planche VII, Fig. C, D, E et F). L'examen de ces cas montre qu'elles n'apparaissent que si l'endoderme pénètre profondément dans l'ectoderme. La formation des c.g.p. semble liée à l'établissement de contacts étroits et durables entre les 2 feuillets. Ces prestations ressemblent à celles décrites après recombinaison de l'ectoderme et de l'endoderme ventral (Chapitre II). Ces résultats plaident en faveur d'une transmission par contact direct de tissu à tissu du signal inducteur.

1-3. Conclusions

Les interactions cellulaires morphogénétiques impliquent que des signaux se transmettent de cellule à cellule. Dès 1955, Holtfreter suggérait que des molécules inductrices puissent diffuser à grande distance vers les cellules cibles. D'autres hypothèses sont basées sur la nécessité de contacts cellulaires (Weiss, 1947, 1958) ou l'action morphogénétique d'une matrice extra-cellulaire (Grobstein, 1955 ; Bernfield et Wessells, 1971). De nombreuses voies ont été explorées pour étudier la transmission de ces signaux inducteurs, la voie biochimique, la plus ancienne, s'efforce d'isoler et de caractériser des substances actives mais les résultats publiés sont incertains et controversés. En ce qui concerne notre problème, l'induction des c.g.p. et du mésoderme, il n'y a aucune preuve de l'existence d'un facteur diffusible émis par l'endoderme ventral et agissant sur l'ectoderme compétent : aucune molécule active n'a été extraite de l'endoderme. Nos résultats ne plaident pas en faveur de cette hypothèse. Nos cultures transfiltre montrent qu'il n'y a pas diffusion de substances actives à travers le filtre interposé. Rappelons que dans nos expériences, les tissus étudiés restent en contact permanent de part et d'autre du filtre pendant 15 jours, les filtres utilisés aux pores nombreux et parfois volumineux (8 μm) ne pourraient s'opposer à la diffusion d'éventuelles substances actives. Cette hypothèse ne pouvant être retenue, nous pensons que le signal inducteur doit se transmettre par contact direct de cellule à cellule. La présence de filopodes traversant les pores du filtre interposé entre l'ectoderme et l'inducteur a été signalée, Kawakami et al (1978) ont observé en microscopie électronique des prolongements cellulaires ectodermiques qui commencent à pénétrer dans les pores de diamètre 0,6 μm après 3 heures de contact. Ces auteurs estiment que l'émission de tels prolongements cellulaires pourrait être caractéristique des cellules mésodermisées. Dans nos expériences transfiltre, nous n'avons jamais observé de prolongements cellulaires ectodermiques même après 15 jours de culture, ceci peut s'expliquer puisque l'ectoderme restant indifférencié n'est pas mésodermisé.

La transmission à distance de facteurs diffusibles est communément admise dans 2 modèles d'interactions, l'induction neurale initiale (revue par Saxen, 1985) et la végétalisation de l'ectoderme de gastrula de *Cynops pyrrhogaster* par la vessie natatoire de Carpe (Kawakami et al, 1978). Récemment, Grunz et Tacke (1986) ont proposé un mécanisme identique pour expliquer la formation du mésoderme chez le Xénope. Leurs résultats sont en contradiction avec nos précédentes conclusions puisqu'ils corroborent l'idée que des contacts cellulaires étroits ne sont pas nécessaires à la mésodermisation de l'ectoderme. Dans leur étude, le fragment ectodermique est détaché du filtre après 16 heures de contact transfiltre avec la masse vitelline puis cultivé séparément pendant 6 jours supplémentaires. Dans cette situation, l'ectoderme donne naissance, dans la

majorité des cas à des dérivés mésodermiques variés, principalement de type ventral, 78% des cas avec du mésenchyme, 49% avec du mésothélium et 64% avec des cellules sanguines. Les structures mésodermiques de type dorsal apparaissent plus rarement, 24% de cas avec myotomes et seulement 4% des cas avec chorde. L'étude au microscope électronique à transmission montre qu'il n'y a pas de prolongements cellulaires à l'intérieur des pores du filtre (0,4 μm de diamètre). Ces résultats semblent donc indiquer que des facteurs diffusibles sont transmis à l'ectoderme cible pendant la durée du contact transfiltre, c'est-à-dire, 16 h. Cette durée correspond d'ailleurs à celle que nous avons déterminée comme étant nécessaire pour provoquer la mésodermisation de l'ectoderme compétent chez le Pleurodèle (Chapitre II).

Les protocoles opératoires différents peuvent expliquer ces résultats apparemment contradictoires. Dans nos expériences, l'endoderme placé contre le filtre correspond uniquement à la partie ventrale isolée d'une seule gastrula, Grunz et Tacke prélèvent par contre la totalité de l'endoderme de 5 blastulas. Ils ne tiennent donc pas compte de la régionalisation de l'endoderme. Ces auteurs admettent que les facteurs diffusibles agissent à proximité immédiate de la masse vitelline, ce qui laisse supposer qu'il faut une certaine concentration de ces substances pour assurer l'induction. Dans nos expériences, si on se place dans cette hypothèse, on peut penser que la quantité d'endoderme placée contre le filtre s'avère insuffisante pour produire les facteurs inducteurs. On peut s'interroger par ailleurs sur les raisons qui ont amené Grunz et Tacke à prélever autant d'endoderme ! Nos résultats obtenus dans des conditions plus conformes à celles qui se déroulent dans un développement naturel plaident donc en faveur de l'existence de contacts cellulaires étroits entre les tissus. Ce type d'induction semble être la règle générale pendant l'organogénèse. De nombreux modèles d'interactions décrits pendant cette période font intervenir habituellement un épithélium et des cellules mésenchymateuses, nous citerons à titre d'exemple les travaux de Gumpel-Pinot (1981) sur la chondrogénèse du membre d'oiseau ou ceux de Saxen et Lehtonen (1978) relatifs à la formation des tubules rénaux. Dans toutes ces expériences transfiltre, on a constaté qu'il y avait des corrélations entre le passage du signal inducteur, reconnu par son effet morphogénétique et l'établissement ou l'absence de contacts intercellulaires à travers les membranes filtrantes.

La durée relativement longue du contact nécessaire à l'induction des dérivés mésodermiques et des c.g.p. que nous avons estimée entre 8 h et 16 h (Chapitre II) peut constituer un argument supplémentaire en faveur de notre hypothèse de transmission du signal inducteur par contact. Des résultats d'expériences d'association temporaire entre l'ectoderme compétent et le chordo-mésoderme présomptif réalisées chez l'Axolotl ont permis à Johnen (1961) de montrer que les premières cellules neuralisées sont obtenues après 30 minutes de contact. Cette phase initiale de neuralisation est suivie d'une seconde phase dite de régionalisation qui nécessite un contact

prolongé avec l'inducteur (Toivonen, 1979). Cette phase est caractérisée par l'établissement de contacts intercellulaires. De même, pendant l'induction des tubules rénaux, les résultats obtenus par Saxen et Lehtonen (1978) montrent la nécessité d'un contact prolongé entre l'inducteur et la cellule cible, bien que le contact s'établisse en moins d'1 heure, il faut au moins 12 heures pour que les cellules induites soient déterminées irréversiblement.

En conclusion, les résultats que nous avons obtenus chez le Pleurodèle semblent pouvoir s'inscrire dans le cadre des interactions de longue durée qui nécessitent des contacts intercellulaires prolongés comme dans l'induction rénale. Les interactions de courte durée pouvant s'effectuer par diffusion de substances comme dans l'induction initiale neuralisante.

2 - Rôle de l'endoderme dans la détermination des c.g.p. et du mésoderme.

Les résultats rapportés dans le chapitre II montrent que l'endoderme ventral est à l'origine de la formation des c.g.p. La mise en culture en "sandwich" de fragments de mésoderme latéral présomptif prélevés au début de la gastrulation (stades 8a et 10) montre que les c.g.p. n'apparaissent qu'exceptionnellement respectivement dans 5 et 0% des cas (Tableau 8). L'implantation intrablastocoelienne du même secteur, isolé au même stade, permet aux c.g.p. de se différencier plus fréquemment, 90,9% au stade 8a et 56% au stade 10 (Tableau 9). On peut penser que dans ces conditions, le fragment mésodermique se trouve placé dans un environnement favorable, voisin de celui qu'il occupe dans le développement normal. Les c.g.p. bénéficieraient ainsi d'interactions tissulaires prolongées qui assureraient leur détermination définitive et leur différenciation, dès le stade 8a ces cellules seraient prédéterminées. Nos expériences précédentes, en particulier, les associations ecto-endodermiques qui ont conduit à la différenciation de c.g.p. en culture amènent à penser que l'effet de l'endoderme ventro-latéral nécessite d'être prolongé. Pour ce faire, nous avons réalisé de nouvelles cultures de mésoderme latéral en y associant de l'endoderme prélevé au même stade.

2-1. Culture en sandwich de mésoderme latéral associé à l'endoderme ventral

2-1-1. Protocole opératoire.

Le mode opératoire est voisin de celui décrit dans le chapitre I. Le fragment de mésoderme latéral présomptif est découpé sur des gastrulas de stades 8a, 9 et 10. La portion d'endoderme ventral située au contact de la zone marginale est également isolée et associée au secteur

mésodermique dans le sandwich ectodermique comme l'indique la figure 12. Les explants ainsi constitués sont mis en culture pendant 15 jours selon les conditions habituelles.

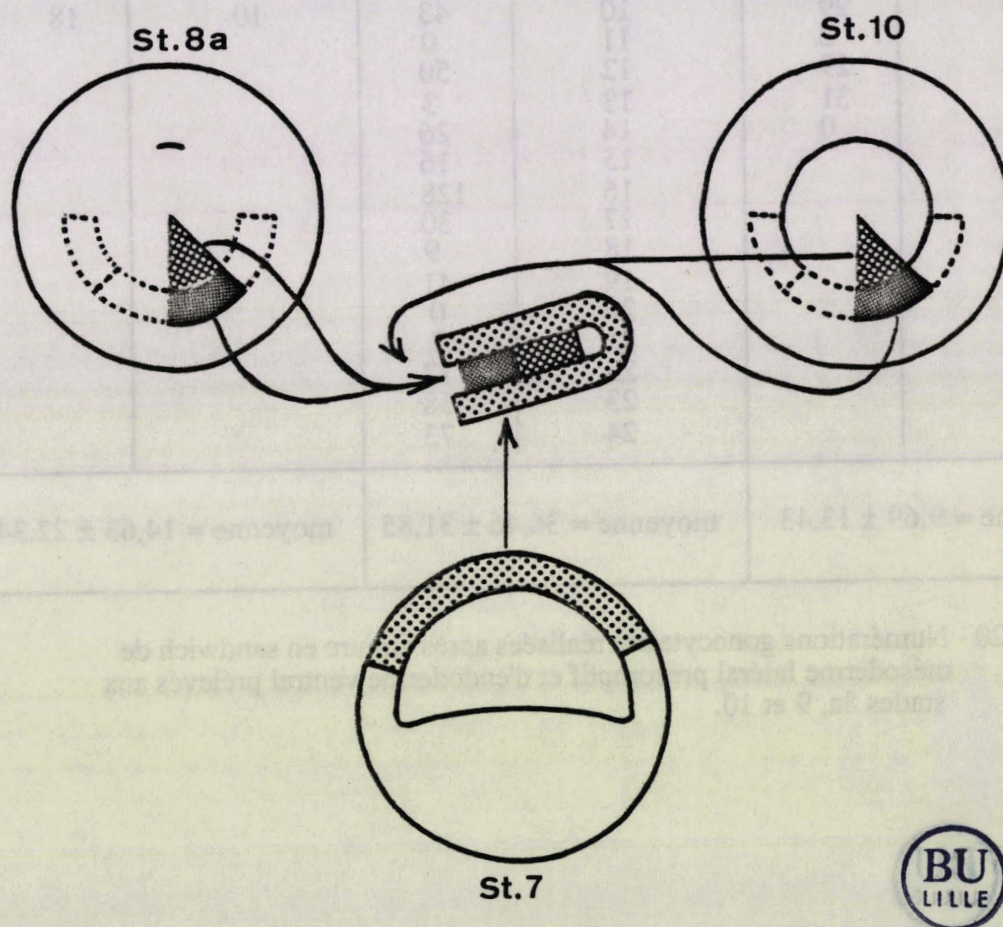


Fig. 12 : Représentation des secteurs de mésoderme latéral présomptif et d'endoderme ventral isolés aux stades 8a, 9 et 10 et cultivés en sandwich dans un lambeau d'épiblaste prélevé sur une blastula âgée (stade 7).

M.L. 8a + Endo. V. 8a		M.L. 9 + Endo. V. 9		M.L. 10 + Endo. V. 10	
Numéro de l'expérience	Nombre de c.g.p.	Numéro de l'expérience	Nombre de c.g.p.	Numéro de l'expérience	Nombre de c.g.p.
1	0	1	51	1	8
2	0	2	0	2	0
3	4	3	0	3	3
4	10	4	34	4	10
5	0	5	80	5	0
6	0	6	31	6	75
7	0	7	70	7	16
8	0	8	18	8	16
9	30	9	30	9	0
10	29	10	43	10	18
11	2	11	0		
12	29	12	50		
13	31	13	3		
14	0	14	26		
		15	16		
		16	128		
		17	30		
		18	9		
		19	41		
		20	0		
		21	7		
		22	77		
		23	58		
		24	73		
moyenne = $9,69 \pm 13,43$		moyenne = $36,46 \pm 31,85$		moyenne = $14,63 \pm 22,34$	

Tableau 20 - Numérations gonocytaires réalisées après culture en sandwich de mésoderme latéral présomptif et d'endoderme ventral prélevés aux stades 8a, 9 et 10.



2-1-2. Résultats

Les cultures évoluent en vésicules apparemment dépourvues de toute organisation (Planche VIII. Fig. A et B). Les résultats histologiques sont rassemblés dans le tableau 19.

Série opératoire	n	Mésen.	Méso.	Myo.	T. Néphr.	c.g.p.
M.L. 8a + Endo. V. 8a	14	14 (100)	14 (100)	0 (0)	13 (93)	7 (50)
M.L. 9 + Endo. V. 9	24	24 (100)	24 (100)	0 (0)	10 (42)	20 (83)
M.L. 10 + Endo. V. 10	10	10 (100)	10 (100)	0 (0)	3 (30)	7 (70)

Tableau 19 - Différenciations obtenues après culture en sandwich de mésoderme latéral présomptif et d'endoderme ventral prélevés aux stades 8a, 9 et 10.

Le tableau fait apparaître une fréquence élevée de différenciations de dérivés mésodermiques de type ventral, mésenchyme et mésothélium s'observent dans tous les cas. La fréquence d'apparition des tubules néphrétiques varie d'une série à l'autre, très élevée au stade 8a, elle diminue en cours de gastrulation. Les c.g.p. sont présentes dès le stade 8a dans 50% des cas, elles occupent des situations traditionnelles au sein des dérivés mésodermiques associés (Planche VIII. Fig. C, D, E et F). On observe une très grande fluctuation à l'intérieur de chaque série, ce qui se traduit par des moyennes aux écarts types démesurés (Tableau 20). Le fragment endodermique associé dans le sandwich reste indifférencié (Planche VIII. Fig. C). Nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus dans les séries opératoires sans apport d'endoderme (Tableau 8). On remarque que la présence d'endoderme améliore la fréquence d'apparition des tubules néphrétiques et des c.g.p. dans des proportions considérables, pour les c.g.p. le taux de différenciation passe de 5 à 50% des cas au stade 8a et de 0 à 70% des cas au stade 10. Les c.g.p. sont parfois regroupées en îlots plus volumineux que ceux observés après implantation du même fragment dans le blastocoele d'une

gastrula hôte (Publication n°2). L'association du mésoderme latéral présomptif avec l'endoderme ventral limitrophe semble bien favoriser la différenciation des c.g.p. dès le stade 8a, cependant l'efficacité de cette influence doit être appréciée et discutée en fonction des aptitudes inductrices de l'endoderme ventral. Dans le chapitre II, nous avons montré que l'endoderme ventral jouait un rôle essentiel dans la formation du mésoderme et des c.g.p. et que sa capacité inductrice maximale au début de la gastrulation (stade 8a) déclinait rapidement aux stades 9 et 10/11. Dans les associations en sandwich dont nous venons de rapporter les résultats, on ne peut donc exclure la possibilité que les c.g.p. décelées aient été induites par le fragment d'endoderme inséré contre l'ectoderme. Seul un marquage préalable de l'ectoderme permettrait de s'assurer de l'origine exacte de ces cellules. Cependant, cette interprétation ne semble pas devoir être retenue. L'examen du tableau 16 laisse apparaître que, dès le stade 9, l'endoderme ventral ne possède plus la capacité inductrice requise, 44% des recombinaisons ecto-endodermiques possèdent seulement des c.g.p. et pourtant, lorsqu'il est associé au mésoderme latéral présomptif de stade 9, il se forme des c.g.p. dans 83% des cas. Cette capacité est encore plus réduite au stade 10 où les c.g.p. ne sont plus observées que dans 33% des recombinaisons, mais si on ajoute cet endoderme au mésoderme latéral présomptif de stade 10, il se différencie des c.g.p. dans 70% des cas.

A l'issue de ces travaux, nous pensons donc que l'endoderme ventral doit jouer un rôle important dans la détermination effective des c.g.p. Un second type d'expérience réalisé à un stade plus avancé a montré que l'influence de l'endoderme se prolonge au-delà de la gastrulation.

2-2. Greffe de mésoderme latéral sur un bourgeon caudal.

Nous avons apprécié l'évolution de la détermination du mésoderme latéral et des c.g.p. en greffant ce territoire en position dorsale ou ventrale sur des jeunes bourgeons caudaux. La greffe ventrale sur de l'endoderme âgé de stade 22 écarte la possibilité de toute interaction de type inducteur avec l'endoderme puisque celui-ci, comme nous l'avons montré, a perdu toutes ses aptitudes inductrices. La greffe en position dorsale permet l'évaluation du degré de détermination du greffon mésodermique en absence de tout contact avec la masse endodermique.

2-2-1. Protocole opératoire

L'opération consiste à greffer sur le ventre ou sur le dos de jeunes bourgeons caudaux de stade 22 un fragment de mésoderme ventro-latéral prélevé sur des gastrulas de stades 8a, 9 et 13.

Age greffon	Position	Nombre	Exp. positives	Fréquence des tissus différenciés					
				c.g.p.	Hématies	Mésen.	Myo.	T. Néphr.	Proctod
Stade 8a	V	26	14 % (100)	13 (93)	10 (71)	8 (57)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	D	36	25 % (100)	0 (0)	6 (24)	13 (52)	14 (56)	19 (76)	3 (12)
Stade 9	V	28	21 % (100)	18 (86)	15 (71)	15 (71)	0 (0)	0 (0)	2 (9)
	D	13	12 % (100)	0 (0)	3 (25)	12 (100)	8 (67)	10 (83)	3 (25)
Stade 13	V	6	6 % (100)	5 (83)	5 (83)	6 (100)	3 (50)	3 (50)	6 (100)
	D	14	14 % (100)	6 (42)	14 (100)	13 (93)	10 (71)	12 (86)	12 (86)

Tableau 21 - Fréquence des tissus différenciés par le mésoderme ventro-latéral en fonction de son stade de prélèvement et de son lieu d'implantation.

V - greffe en position ventrale

D - greffe en position dorsale



La figure 13 illustre le mode opératoire. Les embryons hôtes sont élevés jusqu'au stade 38 où ils sont sacrifiés.

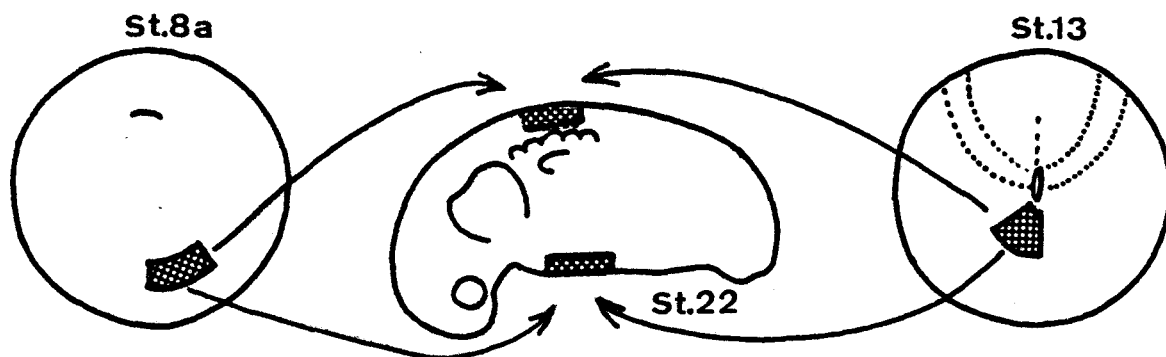


Fig. 13 : Schéma expérimental. Le mésoderme ventro-latéral présumé prélevé sur les stades 8a, 9 et 13 est greffé sur un bourgeon caudal de stade 22. L'implantation est faite soit en position ventrale, en arrière du champ cardiaque, soit en position dorsale, au dessus du champ du membre antérieur.

2-2-2. Résultats

Sont considérées comme négatives, les expériences où les cellules du greffon se sont intégrées aux tissus de l'hôte sans laisser de trace ou bien sont restées groupées pour former un amas de cellules indifférenciées riches en vitellus. Dans les autres cas, le greffon a fourni des prestations variables en fonction du stade duquel il a été prélevé et de son lieu d'implantation (Tableau 21).

- greffe ventrale.

Le mésoderme latéral, provenant de gastrulas de stades 8a et 9 et greffé dans la région ventrale de bourgeons caudaux, révèle une faible capacité de différenciation : cellules sanguines et mésenchymateuses constituent les seuls dérivés mésodermiques observés. Corrélativement, on note une forte proportion d'expériences négatives. Par contre, les cellules germinales sont présentes dans presque tous les cas positifs. Elles sont groupées en îlots bien délimités, situés dans la

somatopleure (Planche IX, C et D), la splanchnopleure ou encore dans un mésentère ventral reliant ces 2 lames. Il n'y a aucune confusion possible avec les c.g.p. de l'hôte dont le nombre et la répartition sont normaux. A partir du stade 13, les structures mésodermiques augmentent en fréquence et en volume : les cellules sanguines sont toujours présentes sous la forme d'énormes amas, les cellules musculaires, plus rares, peu organisées, sont associées à des cellules indifférenciées riches en vitellus. Signalons également dans certains cas la présence d'un proctodéum qui peut s'aboucher à l'intestin et/ou à la peau.

- greffe dorsale

Implanté dans la région dorsale de bourgeons caudaux, le mésoderme latéral présomptif de stades 8a, 9 et 13 se différencie à la base de la nageoire dorsale, au-dessus du tube nerveux, dans une proportion élevée de cas. Les dérivés les plus fréquents sont des hématies, des muscles et des tubules néphrétiques. Selon les individus hôtes, chacune de ces structures est isolée ou associée aux autres dans des proportions variables. Il s'y adjoint fréquemment un proctodéum entouré d'un coelome et s'ouvrant à l'extérieur. Les greffons de stades 8a et 9 ne forment aucune c.g.p. Au stade 13 où elles sont présentes, elles restent groupées à la base de la nageoire et sont donc bien distinctes de celles de l'hôte (Planche IX, A et B).

2-3. Conclusions

Les résultats des greffes confirment nos précédentes observations. Le mésoderme latéral présomptif isolé au stade 8a cultivé isolément en "sandwich" ou greffé dorsalement sur un jeune bourgeon caudal ne forme pas de c.g.p., ces cellules ne sont donc pas véritablement déterminées à ce stade. Il faut attendre la fin de la gastrulation (stade 13) pour qu'elles se différencient de manière autonome.

Par contre, si le mésoderme latéral prélevé au même stade ou au stade 9 est cultivé en présence d'endoderme ventral ou greffé en position ventrale sur un jeune bourgeon caudal, il se forme des c.g.p. Si on tient compte également des résultats des implantations dans le blastocoele de fragments de mésoderme latéral prélevé au stade 8a, il semble se confirmer l'idée que les c.g.p. virtuellement présentes dans le mésoderme latéral de la jeune gastrula ne sont capables de se différencier qu'après un contact prolongé avec l'endoderme (Tableau 22).

Technique utilisée	Hématies	c.g.p.
Culture en sandwich	0	0
Implantation blastocoelienne	42	90,9
Greffe sur bourgeon caudal	Ventre	71
	Dos	24
		93
		0

Tableau 22 - Fréquence en % des hématies et des c.g.p. obtenues à partir du mésoderme ventro-latéral de la jeune gastrula (st. 8a) en fonction de la technique utilisée

Un processus du même ordre intervient dans la formation des hématies. Le mésoderme ventro-latéral qui est aussi à l'origine des cellules sanguines est incapable de leur donner naissance quand il est isolé en culture au stade jeune gastrula. Après implantation intrablastocoelienne, ce même mésoderme différencie des hématies dans 42% des cas (Publication n°2). S'il est greffé sur des bourgeons caudaux, les hématies apparaissent dans 71% des cas en position ventrale et 24% en position dorsale avec le vieillissement du donneur, la fréquence des cellules sanguines reste élevée dans la région ventrale et s'accroît nettement dans la région dorsale (Tableau 21). L'analyse comparée de ces résultats (Tableau 22) nous incite à penser que la détermination de ces cellules se ferait sous l'influence de l'endoderme ventral au cours de la gastrulation. Cette interprétation corrobore celle de Nieuwkoop et Sutasurya (1979) selon lesquels, chez les Urodèles, la formation des hématies semble dépendre d'une action secondaire de l'endoderme ventral. Miura et Wilt (1969) sont parvenus à la même conclusion dans le cas du Poulet.

3- Interactions cellulaires précoces

Les recombinaisons que nous avons réalisées et décrites dans le chapitre II entre l'ectoderme présomptif et l'endoderme prélevé à divers stades de la segmentation et de la gastrulation ont révélé que la capacité inductrice de l'endoderme était régionalisée. L'endoderme dorsal induit dans

l'ectoderme des dérivés mésodermiques représentés en majorité par de la chorde, des myotomes et des tubules néphrétiques, alors que l'endoderme ventral donne naissance à du mésenchyme, des lames latérales, des tubules néphrétiques et aux c.g.p. Rappelons que ces cellules n'apparaissent qu'en absence de chorde et que l'introduction de chordo-mésoderme présomptif dans une recombinaison entre l'ectoderme et l'endoderme ventral empêche complètement la formation de ces cellules. On peut penser que la ségrégation dorso-ventrale qui affecte la différenciation des dérivés mésodermiques et des c.g.p. s'établit à la suite d'interactions cellulaires se produisant au cours de la segmentation. Afin de vérifier cette possibilité, nous avons séparé et mis en culture des blastomères issus de germes de stade 3 (8 blastomères). Les opérations ont été pratiquées à ce stade précis car c'est le stade le plus précoce où l'on peut repérer et isoler facilement les différents blastomères, animaux ou végétatifs, dorsaux ou ventraux, éventuellement impliqués dans ces interactions cellulaires. Les travaux réalisés à ce stade précoce du développement sont peu nombreux et relativement anciens. Ruud (1925) réussit le premier à isoler et à cultiver les 4 micromères et les 4 macromères d'un embryon de Triton. Les 4 micromères isolés se différencient en microblastules qui ne montrent aucun signe d'organisation. Les 4 macromères par contre peuvent édifier un embryon complet. Cet auteur conclut que les macromères végétatifs renferment la totalité du centre organisateur. Vintemberger (1934) obtient des résultats similaires chez *Rana fusca*. Grunz (1977) reprend ces travaux chez le Triton alpestre. Les résultats obtenus l'amènent à conclure à une détermination précoce des blastomères animaux et végétatifs, néanmoins, dans certains cas, l'auteur n'exclut pas la possibilité d'une régulation partielle. Récemment, Kageura et Yamana (1983, 1984, 1986) ont publié une série d'articles consacrés à l'étude du pattern de développement et de sa régulation chez l'embryon de Xénope en se référant uniquement à l'aspect morphologique des prestations obtenues après isolement et culture des blastomères au cours de la segmentation.

3-1. Protocole opératoire.

Les germes de stade 3 (8 cellules) sont soigneusement sélectionnés, seuls, les embryons présentant une symétrie dorso-ventrale indiscutable sont opérés. La figure 14 a représente un germe vu par le pôle animal, on note que la zone dépigmentée occupe la partie supérieure des 2 blastomères végétatifs dorsaux : tous les blastomères peuvent donc être orientés et identifiés (Figure 14b). Les cellules sont séparées mécaniquement avec les instruments en fil de platine. Après isolement, elles sont mises en culture in vitro pendant 3 jours dans le milieu de Leibowitz (L15) dilué à 50% et additionné de sérum de veau foetal (10%). Les explants sont ensuite transférés dans le milieu de Holtfreter et fixés au bout de 15 jours de culture.

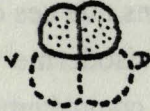
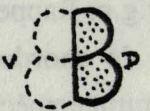
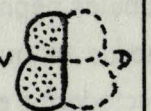
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6
						
	4 bl. Animaux	4 bl. Dorsaux	2 Blastomères vég. dorsaux	4 bl. ventraux	2 blastomères vég. ventraux	4 bl. Végétatifs
Nombre de cas	44	18	12	14	21	44
Explants avec différentiation neurale	1 (2)	18 (100)	2 (17)	0 (0)	0 (0)	8 (18)
Chorde	4 (9)	18 (100)	6 (50)	0 (0)	0 (0)	19 (43)
Myotomes	6 (14)	18 (100)	9 (75)	3 (21)	5 (24)	31 (70)
Tubules néphrétiques	0 (0)	17 (94)	6 (50)	14 (100)	16 (76)	23 (52)
Mésothélium	0 (0)	17 (94)	6 (50)	14 (100)	21 (100)	27 (61)
Mésenchyme	6 (14)	18 (100)	10 (83)	14 (100)	21 (100)	31 (70)
c.g.p.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	11 (78)	10 (48)	3 (7)

Tableau 23 - Différenciations obtenues après culture de blastomères isolés au stade 8 cellules
() fréquence des structures produites.



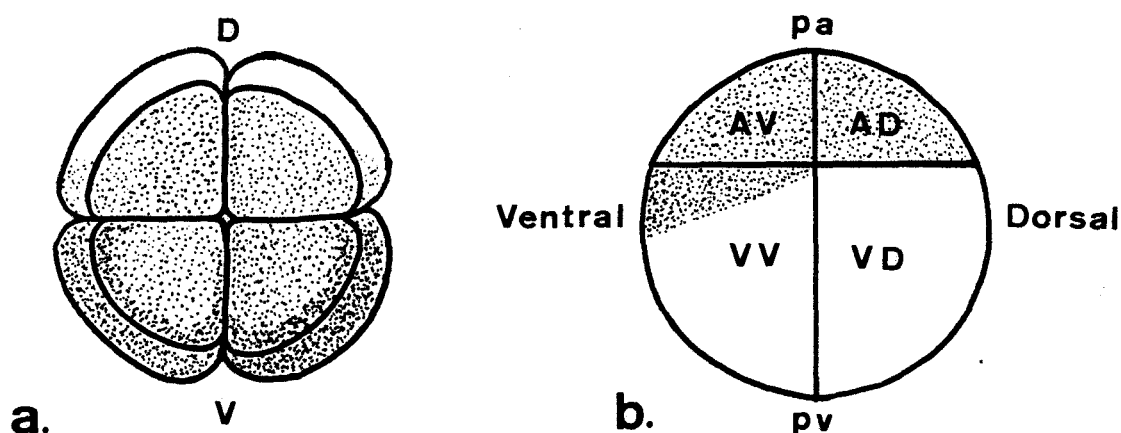


Fig. 14 : Embryon de Pleurodèle au stade 8 cellules (stade 3), on remarque la zone dépigmentée localisée au niveau des blastomères végétatifs dorsaux. (a) vue du pôle animal, (b) vue latérale, le diagramme illustre la nomenclature des différents blastomères. AD, blastomère animal dorsal ; AV, blastomère animal ventral ; D, face dorsale ; pa, pôle animal ; pv, pôle végétatif ; V, face ventrale ; VD, blastomère végétatif dorsal ; VV, blastomère végétatif ventral.

3-2. Résultats

Les observations issues de l'examen histologique des prestations ont procuré de nombreux résultats présentés dans le tableau 23. Seules les données relatives à la culture des 4 blastomères ventraux et des 2 blastomères végétatifs ventraux sont détaillées (Tableaux 24 et 25).

- Expérience n°1 (4 blastomères animaux)

Les blastomères animaux se séparent facilement des blastomères végétatifs. Ils évoluent dans la majorité des cas en vésicules de petite taille, plus ou moins pigmentées (Planche X. Fig. A). L'étude microscopique montre que ces vésicules sont limitées par un épithélium d'origine épidermique (Planche X. Fig. B). Dans quelques cas, nous avons observé des dérivés mésodermiques peu abondants, dans 6 cas, nous avons décelé des myotomes associés à du mésenchyme, 4 d'entre-eux possédaient un fragment de chorde.

- Expérience n° 2 (4 blastomères dorsaux)

Nous séparons la moitié dorsale de l'embryon qui comprend donc les 2 blastomères animaux dorsaux associés aux 2 blastomères végétatifs dorsaux. La séparation des blastomères végétatifs s'avère parfois délicate car des ponts cytoplasmiques peuvent encore persister entre les blastomères végétatifs non totalement divisés. La plupart des explants forment des prestations qui expriment une organisation dorso-ventrale très apparente, certaines d'entre elles ressemblent à s'y méprendre à des larves témoins non opérées (Planche X. Fig. E). L'examen histologique confirme cette impression. Une chorde, des masses somitiques étendues, un tube neural bien développé caractérisent le niveau dorsal (Planche X. Fig. F). Le niveau ventral renferme du mésenchyme, quelques tubules néphrétiques et une cavité coelomique. L'absence des c.g.p. et des cellules sanguines est complète. L'endoderme présomptif contenu dans les blastomères végétatifs contribue à limiter ventralement les prestations en formant un épithélium, dans certains cas, il peut se différencier en tube digestif.

- Expérience n°3 (2 blastomères végétatifs dorsaux)

Par rapport à l'expérience précédente, nous séparons les 2 blastomères végétatifs dorsaux des 2 blastomères animaux. Malgré un nombre important d'opérations réalisées, 12 explants seulement ont pu être analysés. L'aspect morphologique des prestations diffère sensiblement de celui décrit dans l'expérience n°2. Les vésicules sont plus réduites et semblent moins organisées. L'examen microscopique montre que les tissus sont moins différenciés, les dérivés mésodermiques axiaux apparaissent moins fréquemment, 50% de cas avec chorde au lieu de 100% et 75% de cas avec myotomes au lieu de 100%. Les structures neurales deviennent rares (17% des cas) malgré la présence dans la moitié des cas de chorde. L'absence des blastomères animaux peut expliquer ce faible pourcentage, on peut penser que la quantité d'ectoderme présomptif est insuffisante pour permettre au chordo-mésoderme potentiellement situé dans les blastomères végétatifs d'exercer son activité inductrice neuralisante.

- Expérience n°4 (4 blastomères ventraux)

Nous cultivons la moitié ventrale de l'embryon, elle donne naissance à une vésicule transparente où l'on discerne quelques travées de mésenchyme. L'examen histologique montre que les structures mésodermiques axiales sont rares ou absentes, en effet, seules 3 prestations renferment quelques myotomes. Par contre, tous les explants possèdent du mésenchyme et des tubules néphrétiques. Une vaste cavité limitée par un mésothélium occupe la plus grande partie de la vésicule (Planche XI. Fig. A). Nous avons décelé des c.g.p. dans 11 cas sur 14, ces cellules sont toujours associées à des dérivés mésodermiques de type ventral. On les rencontre groupées en îlots,

Numéro de l'expérience	Chorde	Myotomes	T. Néphr.	Mésén.	Méso.	c.g.p.
1	-	-	+	+	+	2
2	-	-	+	+	+	0
3	-	-	+	+	+	67
4	-	-	+	+	+	22
5	-	+	+	+	+	58
6	-	-	+	+	+	120
7	-	-	+	+	+	8
8	-	+	+	+	+	3
9	-	-	+	+	+	98
10	-	-	+	+	+	0
11	-	-	+	+	+	93
12	-	+	+	+	+	0
13	-	-	+	+	+	8
14	-	-	+	+	+	30
Total (%)	0 (0)	3 (21)	14 (100)	14 (100)	14 (100)	11 (78) m=36,36 ± 40,99

Tableau 24 - Différenciations obtenues après culture des 4 blastomères ventraux isolés au st. 8 cellules. (+) Présence
(-) Absence
(%) Fréquence

Numéro de l'expérience	Chorde	Myotomes	T. Néphr.	Mésén.	Méso.	c.g.p.
1	-	+	+	+	+	50
2	-	+	+	+	+	0
3	-	-	+	+	+	0
4	-	-	+	+	+	10
5	-	-	+	+	+	93
6	-	-	+	+	+	121
7	-	-	+	+	+	18
8	-	+	+	+	+	0
9	-	-	+	+	+	0
10	-	-	-	+	+	0
11	-	-	+	+	+	0
12	-	-	+	+	+	0
13	-	-	+	+	+	31
14	-	-	-	+	+	45
15	-	+	+	+	+	0
16	-	-	+	+	+	49
17	-	-	+	+	+	0
18	-	-	+	+	+	0
19	-	-	+	+	+	0
20	-	+	-	+	+	51
21	-	-	-	+	+	0
Total (%)	0 (0)	5 (24)	16 (76)	21 (100)	21 (100)	10 (48) m = 22,86 ± 33,86

Tableau 25 - Différenciations obtenues après culture des 2 blastèmes végétatifs ventraux isolés au st. 8 cellules. (+) Présence
(-) Absence
(%) Fréquence

parfois volumineux, au voisinage d'un tubule néphrétique ou au sein du mésenchyme (Planche XI. Fig. A et B). Le tableau 24 précise leur répartition, la valeur de la moyenne ($36,36 \pm 40,99$) ne signifie pas grand chose car la variabilité numérique est considérable d'un cas à l'autre.

- Expérience n°5 (2 blastomères végétatifs ventraux)

Dans cette opération, seuls les 2 blastomères végétatifs ventraux sont mis en culture. Ils donnent naissance à des vésicules dont l'aspect tant morphologique que microscopique est semblable à celui décrit dans l'expérience n°4. Une grande cavité s'observe au centre de la vésicule, le mésenchyme est peu abondant et tapisse le bord interne de l'épithélium épidermique (Planche XI. Fig. C et D). Comme dans l'expérience précédente, la chorde fait toujours défaut et les myotomes, peu développés, n'apparaissent que dans 24% des cas. Seule différence notable, les c.g.p. ne s'observent plus que dans 48% des cas, elles sont rassemblées en îlots au sein du mésenchyme (Planche XI, Fig. C et D). On retrouve la même variabilité numérique dans les numérations gonocytaires (Tableau 25).

- Expérience n°6 (4 blastomères végétatifs)

Dans cette dernière expérience, nous séparons les 4 blastomères végétatifs, ils se détachent parfaitement des 4 blastomères animaux. L'étude morphologique montre que les vésicules obtenues ne présentent pas une organisation dorso-ventrale bien établie, elles sont généralement volumineuses et semblent renfermer une masse de tissus abondante (Planche X. Fig. C). L'examen histologique montre que ces vésicules contiennent effectivement des dérivés mésodermiques variés (Planche X. Fig. D). Près de la moitié d'entre-elles (43%) présentent des dérivés mésodermiques dorsaux bien différenciés (chorde et myotomes) associés à des tubules néphrétiques et à des dérivés mésodermiques ventraux (mésenchyme et mésothélium). La présence de structures neurales bien développées est peu fréquente (18% des cas seulement), comme dans l'expérience n°3 il n'y a pas de correspondance entre la présence de chorde et la différenciation de tissu neural. Les c.g.p. n'apparaissent qu'exceptionnellement, dans 3 cas et en petit nombre (respectivement 28, 22 et 11 cellules). L'étude détaillée de ces 3 prestations révèle qu'elles ne sont associées à la présence de chorde que dans un seul cas.

3-3. Discussion

D'une manière générale, nos résultats peuvent s'interpréter en tenant compte de la carte des

ébauches présumptives établie classiquement chez les Amphibiens Urodèles (Fig. 15).

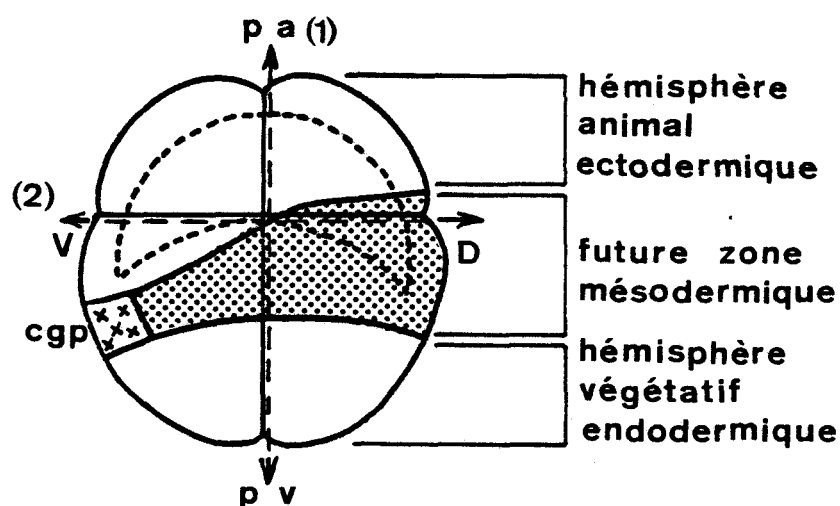


Fig. 15 : Représentation schématique des 2 plans (1 et 2) de séparation des blastomères au stade 8 cellules. La ligne en pointillé délimite le blastocoele présumptif. cgp, emplacement présumptif des c. g. p. ; D, face dorsale ; pa, pôle animal ; pv, pôle végétatif ; V, face ventrale.

En superposant cette carte à un germe de stade 3, on peut connaître, à priori, les diverses potentialités des blastomères isolés ou associés entre eux. Néanmoins, la nature et la répartition des aires présumptives présentes dans les blastomères dépendent de la position des premiers sillons de division. Le 1er plan de segmentation ne coïncide pas toujours exactement avec le plan de symétrie bilatérale et malgré les précautions prises pour sélectionner les germes, il n'est pas certain que les blastomères qualifiés de dorsaux correspondent toujours à la future face dorsale de l'embryon. De même, le 3ème plan de segmentation peut varier en latitude d'une ponte à l'autre et même parmi les oeufs d'une même ponte, ce qui peut entraîner des résultats différents.

Il faut savoir enfin que la carte des territoires présomptifs à laquelle nous nous référons pour le Pleurodèle est celle établie initialement pour le Triton, il faudra en tenir compte dans l'interprétation de nos résultats et dans leur comparaison avec ceux obtenus avec d'autres espèces (Anoures comme Urodèles).

Les blastomères animaux donnent naissance, dans 86% des cas, à des vésicules épidermiques dépourvues de dérivés mésodermiques, ils évoluent donc conformément à leur valeur présomptive. Par contre dans les autres cas, de la chorde, des myotomes et du mésenchyme se sont différenciés. On peut supposer qu'une partie des territoires présomptifs de ces dérivés mésodermiques a été incorporée dans les blastomères animaux par suite du léger décalage vers l'équateur du plan de segmentation latitudinal. Ces résultats sont comparables à ceux décrits dès 1925 par Ruud chez *Triturus taeniatus* et par Vintemberger en 1935 chez *Rana fusca*. Grunz (1977) obtient des résultats similaires chez *Triturus alpestris*, il observe cependant une proportion plus importante de cas avec différenciations neurales ou mésodermiques (30%). Les 4 blastomères végétatifs fournissent en quantité variable les principaux dérivés mésodermiques qui s'organisent selon un axe dorso-ventral plus ou moins apparent. La chorde se différencie dans 43% des cas mais ne s'accompagne de structures neurales que dans 18% des cas. La faible quantité d'ectoderme présomptif disponible au niveau des blastomères végétatifs explique sans doute cette anomalie. Les résultats des expériences 2 et 3 confirment notre hypothèse, dans l'expérience 3 où seuls les blastomères végétatifs dorsaux sont cultivés, il n'y a pas ou peu d'ectoderme présomptif et les fréquences de différenciation de chorde et de structures neurales associées sont proches de celles décrites dans l'expérience 6. Au contraire, dans l'expérience 2, les 2 blastomères animaux restent accolés aux 2 blastomères végétatifs et tous les explants fournissent de la chorde et des structures neurales. Dans ce cas, les explants expriment clairement leur polarité dorso-ventrale. Grunz (1977) observe un phénomène analogue chez le Triton alpestre, les 4 blastomères végétatifs produisent des différenciations chordales dans 85% des cas, mais 54% seulement des explants possèdent une moelle épinière. Les structures encéphaliques sont plus rares (19% des cas).

Ces résultats suggèrent à l'auteur que la réalisation d'un embryon presque complet dépend de la quantité d'ectoderme présomptif disponible. Il tire la conclusion que les blastomères végétatifs comme les blastomères animaux sont déterminés à ce stade, mais il n'exclue pas la possibilité d'une régulation partielle, l'auteur fait référence aux travaux de Holtfreter (1936) et Holtfreter H.B. (1965) selon lesquels la lèvre dorsale blastoporale isolée pourrait fournir des dérivés ectodermiques en plus de la chorde et des myotomes. Une régulation encore plus importante des déficits serait encore possible à ce stade du développement, selon Vintemberger (1934) les macromères isolés chez *Rana fusca* seraient capables de former un embryon harmonieusement constitué. Cet embryon présenterait des formations (la ventouse par exemple) dont les ébauches sont normalement situées

au niveau des micromères. Les résultats que nous avons obtenus chez le Pleurodèle plaident plutôt en faveur d'une détermination précoce des différents blastomères. Lorsqu'ils sont séparés et cultivés isolément, ils n'expriment généralement que leurs potentialités. Les blastomères végétatifs dorsaux fournissent principalement des dérivés mésodermiques axiaux (chorde) ou dorsaux (myotomes) alors que les blastomères végétatifs ventraux donnent naissance à des dérivés mésodermiques ventraux (mésenchyme et mésothélium) associés aux c.g.p. Nous observons que les tubules néphrétiques apparaissent dans les 2 cas. Les numérations gonocytaires effectuées dans les expériences 4, 5 et 6 montrent des variations importantes. Si ces cellules étaient déterminées, elles devraient se différencier dans les mêmes proportions puisque les dérivés mésodermiques associés à leur formation sont toujours présents. Il faut donc admettre que ces cellules ne sont pas véritablement déterminées au stade 3 et que des interactions entre les blastomères végétatifs ventraux et les blastomères voisins peuvent influencer leur différenciation.

Ces résultats s'expliquent en partie si on souscrit aux conclusions émises à la fin du chapitre II. Le mésoderme et les c.g.p. ont une origine épigénétique, ils apparaissent comme le résultat d'interactions de type inducteur entre l'ectoderme compétent et l'endoderme. Dans l'expérience 4, où les blastomères animaux sont conservés, les c.g.p. sont décelées dans 78% des cas, lorsqu'on enlève ces blastomères animaux, on ne rencontre plus ces cellules que dans 48% des cas (Exp. 5). On peut penser qu'une partie des cellules ectodermiques fournies par les blastomères animaux a pu être induite en c.g.p. et en dérivés mésodermiques par l'endoderme ventral localisé dans les 2 blastomères végétatifs ventraux. Le même raisonnement peut être tenu pour expliquer la diminution des fréquences de différenciation des dérivés mésodermiques observés dans l'expérience 6, les mêmes dérivés sont développés dans l'expérience 2 (structures dorsales) et dans l'expérience 4 (structures ventrales) mais en proportions plus élevées. Des corrélations peuvent donc être établies entre la quantité d'ectoderme utilisable et la fréquence d'apparition des c.g.p. et des principaux dérivés mésodermiques. Sudarwati et Nieuwkoop (1971) ont d'ailleurs démontré, à la suite d'expériences de recombinaisons entre l'ectoderme et l'endoderme que la formation du mésoderme était proportionnelle à la quantité d'ectoderme disponible. Par contre, la disparition presque complète des c.g.p. dans l'expérience 6 ne peut être attribuée au seul manque d'ectoderme utilisable, les résultats rapportés dans le chapitre II suggèrent par contre que le chordo-mésoderme pourrait jouer un rôle inhibiteur dans la différenciation des c.g.p. On peut penser que dans cette expérience, le chordo-mésoderme formé par l'endoderme dorsal exerce une action inhibitrice sur la différenciation des c.g.p. normalement induites par l'endoderme ventral. Cette activité inhibitrice ne semble pas être l'apanage du seul chordo-mésoderme présomptif ; en effet, Sutasurya et Nieuwkoop (1974) estiment que c'est l'ensemble des structures dorsales induites par l'endoderme qui pourrait manifester cette action.

DISCUSSION GENERALE

Les résultats que nous venons d'exposer démontrent que chez le Pleurodèle, les c.g.p. sont localisées précocement dans le feuillet mésodermique. Une étude expérimentale des conditions de détermination et de différenciation de ces cellules nous a permis de préciser le rôle et l'importance de la stimulation endoblastique. Une hypothèse relative au mode de transmission du signal inducteur émis par l'endoderme est proposée, les recombinaisons temporaires effectuées entre l'ectoderme et l'endoderme ainsi que les cultures transfiltre réalisées plaident en faveur d'une transmission par contact direct de cellule à cellule entre les 2 feuillets réactifs. Nous discuterons successivement les conclusions majeures de notre travail.

- Localisation précoce des c.g.p.

Chez le Pleurodèle, les c.g.p. ne peuvent être identifiées avec certitude qu'au stade 33, c'est-à-dire à un stade avancé du développement. Seules des méthodes expérimentales permettent de les mettre en évidence avant leur mise en place dans les crêtes génitales. La culture en sandwich de petits fragments de la zone marginale ventrale (Z.M.V.) prélevés au stade 5 (stade jeune blastula) nous a permis de déceler la présence de c.g.p. associées aux dérivés mésodermiques ventraux (mésenchyme et mésothélium). La fréquence d'apparition des c.g.p., faible au stade 5 (10% des cas) reste peu élevée au stade 6 (25% des cas). La Z.M.V. isolée, située dans la zone de contact entre les blastomères animaux et végétatifs, correspond au futur mésoderme ventro-latéral. Il n'est pas exclu qu'une partie des blastomères isolés contiennent de l'endoderme présomptif ; comme ce tissu est capable d'induire des c.g.p. et du mésoderme, nous ne pouvons certifier que les c.g.p. décelées sont effectivement déterminées au stade 5, elles peuvent se former ultérieurement à la suite d'interactions qui surviendraient pendant la culture.

Les cultures de mésoderme latéral réalisées au début de la gastrulation ne plaident pas en faveur d'une détermination précoce des c.g.p., les prestations analysées ne renferment que des dérivés mésodermiques ventraux et les c.g.p. sont absentes. Il faut opérer en fin de gastrulation (st. 12) pour obtenir des différenciations fréquentes de ces cellules. Par contre, si on implante dans le

blastocoele de jeunes gastrulas des fragments de ce même mésoderme latéral présomptif isolé au stade 8a, on constate que des c.g.p. se différencient à partir des territoires prélevés (Maufroid et Capuron, 1973). Nous pensons que le contact qui s'établit entre le fragment de mésoderme latéral et l'endoderme ventral de la gastrula hôte favorise la différenciation des c.g.p. Cette expérience fait ressortir le rôle décisif que joue vraisemblablement l'endoderme dans l'acquisition de leur détermination définitive. Dès l'apparition de l'encoche blastoporale, les c.g.p. sont potentiellement situées dans le mésoderme ventro-latéral (Nieuwkoop, 1946 ; Smith, 1964) mais leur détermination irrémédiable nécessite une interaction complémentaire avec l'endoderme ventral. Les greffes de territoire mésodermique en position dorsale ou ventrale de bourgeons caudaux confortent cette thèse. Le mésoderme ventro-latéral de jeune gastrula (st. 8a) greffé sur le ventre d'un bourgeon caudal différencie des cellules germinales dans la presque totalité des cas. Par contre, en position dorsale, les c.g.p. absentes avec le mésoderme de stades 8a et 9 apparaissent avec le mésoderme de stade 13 et leur fréquence augmente au fur et à mesure que s'effectue la neurulation (Capuron et Maufroid, 1981). Nakamura et Matsuzawa (1967) ont cultivé en sandwich des fragments de la zone marginale prélevés à divers stades de la segmentation chez *Triturus pyrrhogaster*. Ces auteurs ont montré que les capacités de différenciation du mésoderme apparaissaient au stade morula âgée puis se développaient au stade jeune blastula, ils n'ont pas signalé la présence des c.g.p. S'il y a accord sur la localisation précoce des c.g.p. dans le mésoderme latéral de la jeune gastrula, l'origine de ces cellules n'est cependant pas clairement établie, 2 hypothèses sont communément retenues :

- dans la première, les c.g.p. naissent à partir d'éléments prédéterminés au sein du mésoderme ventro-caudal
- dans la seconde, les c.g.p. se forment épigénétiquement à partir de cellules somatiques totipotentes.

- Origine des c.g.p. et du mésoderme

Les travaux concernant la formation des c.g.p. sont indissociables de ceux relatifs à la formation du mésoderme. Nos expériences ont montré que chez le Pleurodèle, la différenciation du mésoderme et des c.g.p. résulte d'une interaction entre l'endoderme et l'ectoderme (Maufroid et Capuron, 1977). Ceci confirme les résultats obtenus précédemment. Ogi (1967, 1969) obtient la différenciation de structures mésodermiques en associant des micromères et des macromères d'embryons de Triton prélevés aux stades de la morula et de la blastula. Nieuwkoop (1969) réalise des recombinaisons à partir de blastulas moyennes et âgées d'*Axolotl*, les structures mésodermiques qui se forment dérivent exclusivement du pôle animal soumis à l'influence inductrice du pôle végétatif endodermique. L'origine purement ectodermique des structures induites est attestée par les résultats

des recombinaisons xénoplastiques et par l'utilisation du marquage radioactif (Nieuwkoop et Ubbels, 1972). Cette capacité de l'endoderme à induire des dérivés mésodermiques est générale, Nakamura et al (1971), Sudarwati et Nieuwkoop (1971) l'ont démontrée chez le Xénope. La présence de c.g.p. parmi les structures mésodermiques induites amènent Nieuwkoop à considérer que chez les Urodèles, les c.g.p. ont une origine épigénétique et qu'elles se forment à partir d'éléments somatiques totipotents de l'hémisphère animal. Les c.g.p. peuvent être induites dans toute la calotte ectodermique de la blastula (Sutasurya et Nieuwkoop, 1974).

Nous avons montré que chez le Pleurodèle, la capacité inductrice de l'endoderme est régionalisée et qu'elle varie dans le temps. Présente dès le stade 6 (blastula moyenne) l'aptitude à induire des c.g.p. augmente en fin de segmentation pour atteindre sa valeur maximale au début de la gastrulation (st. 8a). Elle décroît ensuite rapidement pour s'annuler en début de neurulation (st. 13/14). Chez l'Axolotl, Boterenbrood et Nieuwkoop (1973) n'ont étudié l'évolution de la capacité inductrice de l'endoderme le long de l'axe dorso-ventral que pendant les premiers stades du développement. Leurs résultats indiquent que le déclin de l'aptitude inductrice commence au stade 9 (blastula âgée) au niveau dorsal et se poursuit en direction ventrale qu'il n'atteint qu'au stade 10⁻ (très jeune gastrula).

Des travaux réalisés chez l'Axolotl comme chez le Pleurodèle, on peut déduire que la différenciation du mésoderme aboutit à 2 types de structures :

- un type dorsal caractérisé par la formation de chorde, entourée de 2 rangées de myotomes bien organisés et par l'absence de cellules sanguines.
- un type ventral caractérisé par l'absence de chorde et par l'apparition en grand nombre des c.g.p..

Les tubules néphrétiques se forment dans les 2 types. Il faut souligner que dans les recombinaisons réalisées avec l'endoderme dorsal chez l'Axolotl, des c.g.p. peuvent se différencier en nombre restreint. Dans ce cas, elles sont toujours emprisonnées dans des dérivés du mésoderme ventro-caudal. Dans nos expériences chez le Pleurodèle, l'endoderme dorsal n'induit des c.g.p. que de manière exceptionnelle.

Sutasurya et Nieuwkoop (1974), étudiant la capacité de l'hémisphère animal à former du mésoderme et des c.g.p., ont montré que les c.g.p. peuvent se former à partir de n'importe quelle région de l'hémisphère animal ectodermique de la blastula, la compétence de l'ectoderme croissant du pôle animal vers l'équateur. La zone marginale possède donc la capacité la plus élevée pour former des c.g.p.. Ces cellules apparaissent bien comme un élément caractéristique des structures mésodermiques de type ventral. Dans les conditions normales de développement, la formation des c.g.p. est restreinte à la zone marginale ventro-latérale par suite de l'influence inhibitrice exercée par le chordo-mésoderme au niveau dorsal.

Nous avons fourni un argument supplémentaire en faveur de l'origine ectodermique des c.g.p. en réalisant des associations temporaires entre l'ectoderme et l'endoderme ventral ; après un contact d'une durée suffisante, l'extirpation de l'endoderme n'a pu empêcher l'apparition de c.g.p. dont l'origine ne peut donc être qu'ectodermique. Nous avons par là même, déterminé la durée minimale de contact entre les 2 feuillets (8 h à 16 h) nécessaire pour que s'effectue l'induction. Ces conclusions confirment celles émises par Kotani (1957, 1958) et par Kocher-Becker et Tiedemann (1971) qui dans leurs expériences chez *Triturus pyrrhogaster* ont établi une origine ectodermique des c.g.p..

L'ensemble de ces résultats suggèrent que chez les Urodèles, les c.g.p. proviennent de cellules ectodermiques totipotentes. Ces cellules se différencient en c.g.p. dans les zones latérales et ventrales de l'hémisphère animal sous l'influence inductrice exercée par les cellules vitellines ventrales. Dans nos expériences d'association temporaire entre l'ectoderme et l'endoderme, les c.g.p. n'apparaissent jamais isolément, elles sont toujours associées à des dérivés du mésoderme ventro-latéral. A notre connaissance, ce fait est général, les c.g.p. ne se différencient qu'au sein de structures mésodermiques. On peut se demander, dans ces conditions, si elles sont induites séparément des cellules mésodermiques où si elles se différencient à partir de cellules déjà déterminées comme mésodermiques. On peut envisager 3 éventualités (Dixon, 1981) : les différences entre les cellules mésodermiques et les c.g.p. sont préexistantes (1), elles reçoivent des signaux inducteurs différents (2) ou elles s'autodifférencient (3). La première hypothèse est peu vraisemblable puisque Sutasurya et Nieuwkoop (1974) ont démontré que toutes les cellules de l'hémisphère animal étaient capables de former des c.g.p. Dans la seconde hypothèse, comme toutes les cellules induites par l'endoderme ventral reçoivent la même information, il faudrait admettre que les signaux reçus par les cellules souches des c.g.p. et des cellules mésodermiques diffèrent quantitativement et non qualitativement. Signalons que Yamada (1950) et Forman et Slack (1980) suggèrent des mécanismes du même type pour expliquer la formation de certains dérivés mésodermiques. Nieuwkoop et Sutasurya (1979) ont émis une troisième hypothèse selon laquelle les c.g.p. constituent l'un des éléments d'autodifférenciation du mésoderme ventro-latéral, encore faudrait-il définir le sens du terme "autodifférenciation".

En dépit des nombreuses preuves expérimentales accumulées en faveur de l'origine épigénétique des c.g.p., Michael (1984) ne rejette pas l'éventualité de l'existence d'éléments prédéterminés au sein de l'hémisphère animal. Il conclue de ses résultats que la capacité à induire des c.g.p. n'est pas répandue dans toute la calotte animale mais qu'elle est restreinte à la seule zone périphérique. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Sutasurya et Nieuwkoop (1974) chez l'*Axolotl*. Ceci nous amène à envisager l'existence d'un déterminant germinal. Williams et Smith (1971) sont les seuls à avoir décrit des granules germinaux au niveau de la zone marginale de l'oeuf

fécondé indivis d'Axolotl. Cette observation n'a jamais été confirmée ni étendue aux autres Urodèles. Des études ultrastructurales réalisées chez *Triturus pyrrhogaster* par Hamasima et Kotani (1977) et chez *Ambystoma mexicanum* par Ikenishi et Nieuwkoop (1978) n'ont révélé la présence de structures particulières ("nuage matériel") qu'aux stades larvaires. La présence des c.g.p. au sein du mésoderme latéral dès le stade jeune gastrula étant démontrée, on pouvait s'interroger sur l'existence de déterminants germinaux au sein de certaines cellules de ce territoire. Smith, Michael et Williams (1983) ont donc examiné cette région au microscope électronique. Ils ont recherché des cellules qui posséderaient de nombreuses mitochondries et une morphologie nucléaire spéciale, caractéristiques des c.g.p.. Si certaines structures particulières assimilables à des corps denses ont été repérées, rien ne permet d'affirmer qu'elles soient issues des granules germinaux décrits chez l'oeuf insegmenté.

En conclusion, il n'existe pas de preuve à l'heure actuelle de l'existence de déterminants germinaux responsables de la différenciation des c.g.p. chez les Urodèles. Au contraire, nos résultats expérimentaux ainsi que ceux publiés par Nieuwkoop et al confortent la thèse d'une origine épigénétique des c.g.p. chez les Urodèles.

- Transmission du signal inducteur

Les résultats des cultures transfiltre que nous avons réalisées chez le Pleurodèle plaident en faveur d'une transmission par contact direct de cellule à cellule du signal inducteur. Les conditions expérimentales permettent la diffusion d'éventuelles substances inductrices mais l'association ecto-endodermique dans ces conditions n'a jamais conduit à l'obtention de structures mésodermiques et de c.g.p. On peut donc écarter, dans l'interprétation de cette expérience, l'idée de la diffusion de substances actives entre les tissus réactifs.

Nos conclusions s'opposent à celles formulées récemment par Grunz et Tacke (1986), selon lesquels des facteurs transmissibles sont responsables de la mésodermisation des cellules ectodermiques. Un mécanisme identique a été proposé par Kawakami et al (1978) pour rendre compte de l'induction de dérivés mésodermiques dans l'ectoderme de *Cynops pyrrhogaster* par un inducteur hétérogène, la vessie natatoire de Carpe. La diversité des espèces utilisées et les conditions de culture différentes peuvent expliquer ces résultats contradictoires.

La base moléculaire de l'induction mésodermique et des c.g.p. est inconnue. Des facteurs inducteurs mésodermiques ont été isolés de sources diverses mais seul le facteur végétalisant extrait d'embryons de Poulet de 9 à 13 jours a permis l'induction de c.g.p. au sein de l'ectoderme de gastrula de Triton (Kocher-Becker et Tiedemann, 1971). Mis au contact de l'ectoderme de Xénope, ce facteur induit une grande variété de tissus mésodermiques (Asashima et Grunz, 1983 ; Grunz,

1983). Un traitement bref à faible concentration induit préférentiellement des cellules sanguines alors qu'un traitement long à forte concentration favorise la différenciation de chorde et de myotomes (Grunz, 1983). Ces résultats suggèrent que la formation des différents dérivés mésodermiques résulte de la diffusion d'un seul facteur inducteur. Cette conception ne concorde pas avec nos résultats. Nous pensons au contraire, en accord avec les idées émises par Smith et al (1985) qu'il existe au moins 2 signaux inducteurs : 1 signal responsable de l'induction des structures dorsales et 1 signal provoquant la différenciation des structures ventrales et des c.g.p. Il faudrait vérifier l'existence de ces signaux et essayer de les caractériser au niveau moléculaire. Cette remarque concerne également les facteurs inducteurs transmissibles par diffusion que Grunz et Tacke (1986) pensent avoir mis en évidence à l'issue de leurs cultures transfiltre. Tout récemment, Smith (1987) a entrepris l'étude d'un nouveau facteur mésodermisant produit par la culture de cellules de la lignée XTC du Xénope. Des fragments ectodermiques cultivés dans un milieu conditionné par ces cellules inductrices fournissent des dérivés mésodermiques dorsaux. Une analyse biochimique préliminaire a montré que ce facteur était sensible à la trypsine et possédait un poids moléculaire proche de 16.000.

Dans ces situations expérimentales, ces facteurs ont montré qu'ils étaient capables d'induire des dérivés mésodermiques, mais on peut se demander si ces facteurs sont aussi présents dans l'embryon normal. On peut douter de leur existence tant que des molécules actives n'auront pas été isolées. La connaissance des mécanismes impliqués dans l'induction des c.g.p. et du mésoderme reste incomplète. En dépit de nombreux travaux réalisés et que nous avons rapportés dans ce mémoire, les conclusions restent incertaines et parfois contradictoires, il convient donc de rechercher de nouvelles informations concernant la nature et le mode de transmission des signaux impliqués dans les interactions ecto-endodermiques. Seule la voie biochimique permettrait d'isoler et de caractériser au niveau moléculaire les facteurs actifs transmis à l'ectoderme cible ; ce qui pose le problème du choix de la technique biochimique à mettre en oeuvre, en effet, les embryons de Pleurodèle sont petits et les substances actives sont sans doute présentes à très faible concentration. A cet égard, le travail engagé par Smith (1987) paraît être plus prometteur.

Le mode de transmission doit être précisé et en particulier la nécessité de contacts intercellulaires, nos expériences en ce domaine ne pouvant être considérées comme définitives.

L'emploi de marqueurs sélectifs comme la HRP, le TRITC ou la FL Dx permettrait de vérifier certains résultats, en particulier l'origine des tissus induits dans les expériences de recombinaisons et de culture en sandwich de fragments de mésoderme latéral en présence d'endoderme.

PUBLICATION n°1

- J.P. MAUFROID et A.P. CAPURON, 1972 : Migration des cellules germinales primordiales chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles Waltlii*. *Michah. Wilhelm Roux' Archiv*, 170, 234-243.

Wilhelm Roux' Archiv 170, 234—243 (1972)
© by Springer-Verlag 1972

Migration des cellules germinales primordiales
chez l'Amphibien Urodele *Pleurodeles waltlii* Michah

J.-P. Maufroid et A. P. Capuron

Université des Sciences et des Techniques, Lille, France

Reçu Novembre 30, 1971/Avril 13, 1972

Migration of the Primordial Germ Cells in Urodele Amphibian *Pleurodeles waltlii* Michah

Summary. Unilateral removal of ectoderm and subjacent mesoderm practised on *Pleurodeles waltlii*, at different stages of the neurula and tailbud embryo, causes a more or less important reduction of larval gonocytes on the operated side. It has thus been possible to locate the germ cells at the stage of the young neurula (st. 15) in the neighbourhood of the blastopore. Between stages 21 and 22, these cells begin a dorsal migration along the pronephric duct. The absence or reduction of the number of gonocytes, as a consequence of the extirpation of an ecto-mesodermal area, leads us to think that the germ cells are located in the mesoderm and that their removal cannot be compensated by presumptive somatic cells.

Résumé. Des ablations unilatérales d'ectoderme et de mésoderme sous-jacent, faites à divers stades de la neurula et du bourgeon caudal, chez *Pleurodeles waltlii*, ont provoqué chez la larve un déficit plus ou moins important des gonocytes du côté opéré. Il a été ainsi possible de localiser au stade de la jeune neurula (st. 15) les cellules germinales au voisinage du blastopore. Entre les stades 21 et 22, ces cellules amorcent une migration en direction dorsale le long de l'uretère primaire. L'absence ou la réduction du nombre des gonocytes à la suite de l'excision d'un territoire ecto-mésodermique donne à penser que les cellules germinales sont localisées dans le mésoderme et que leur ablation ne peut être compensée par les cellules somatiques présomptives.

Introduction

Les cellules germinales primordiales des Amphibiens ont suscité de nombreux travaux. La difficulté majeure de leur étude provient du fait que ces cellules ne sont pas identifiables avant leur mise en place dans les crêtes génitales, ce qui correspond à un stade relativement avancé du développement.

Chez les Anoures, qui ont fait l'objet de la plupart des recherches en ce domaine, l'origine et la migration des c.g.p. sont clairement établies. Chez les Urodèles, où les travaux sont plus restreints, nous citerons ceux de Humphrey (1925), Nieuwkoop (1946). Ce dernier a démontré chez *Triturus alpestris*, *T. cristatus* et *Ambystoma mexicanum*, que les c.g.p. sont d'origine mésodermique et qu'elles se forment à partir du territoire présomptif des lames latérales. Ces résultats ont été confirmés par Smith (1964) chez *Ambystoma mexicanum* grâce à des échanges au stade gastrula de mésoderme latéral présomptif entre les génotypes noir et blanc. Ce marquage génétique permettait en outre à Smith de démontrer que les c.g.p. étaient les cellules mères des futurs gamètes. Sur ce dernier point, l'unanimité n'est pas réalisée et plusieurs auteurs estiment que les c.g.p. ont une différen-

ciation épigénétique à partir des tissus somatiques. Selon Asayama (1950, 1961), chez *Triturus pyrrhogaster*, ces cellules pourraient se former à partir du mésoderme latéral à un stade aussi avancé que celui du bourgeon caudal. Pour Amanuma (1957), l'ablation du mésoderme intermédiaire présomptif de la gastrula et de la neurula de *T. pyrrhogaster* et *Hynobius nebulosus* n'affecte pas le nombre de gonocytes.

Dans le cadre de ce travail, nous avons tenté de localiser les c.g.p. au stade neurula et de suivre leur migration en pratiquant à des stades précis des ablations localisées.

Matériel et techniques

Nous avons utilisé des embryons de *Pleurodeles waltlii*. Les stades sont déterminés selon la table chronologique du développement de Gallien et Durocher (1957). Le milieu opératoire est la solution de Holtfreter stérilisée et additionnée de pénicilline ou streptomycine. Le principe de l'intervention réside dans l'ablation élective et unilatérale d'un fragment d'ecto-mésoderme. On découpe un lambeau d'ectoderme avec le mésoderme sous-jacent dans la région ventro-latérale en prenant soin de ne pas léser le blastopore. Le matériel excisé se détache parfaitement de l'endoderme sur lequel il repose. Divers types d'ablations ont été réalisés selon les stades, ils sont représentés schématiquement sur la fig. 1.

Stade neurula:

ablation ventrale postérieure: type A.

Stades du bourgeon caudal:

ablation ventrale: type B;

ablation latéro-ventrale: type C;

ablation latérale: type D;

ablation de l'ecto-mésoderme intermédiaire: type E;

ablation de l'ecto-mésoderme intermédiaire postérieur: type F, type G.

La mortalité post-opératoire, pratiquement nulle aux stades du bourgeon caudal, atteint environ 10% chez les neurulas. D'une manière générale et pour l'ensemble de nos opérations, seuls les animaux où la régulation des territoires enlevés s'est déroulée normalement ont été élevés et pris en considération. L'examen histologique est effectué selon les méthodes classiques; peu avant la prise de nourriture, les animaux sont fixés au Bouin-Hollande sans acide acétique. Après inclusion à la paraffine ils sont débités en coupes transversales de 7 μ . Celles-ci sont colorées à l'hémalum éosine ou au picro-indigo-carmin.

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

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

où σ_1 et σ_2 représentent les écarts types de chaque échantillon et n le nombre d'individus opérés. Comme ce nombre est inférieur à 30, la distribution de l'écart réduit $t = d/Sd$ suit la loi de Student. Pour être considérée comme significative au seuil de probabilité de 95%, la différence d devra être supérieure à $t_{0.05} \cdot Sd$, la valeur de $t_{0.05}$ étant fourni par la table de Student. Cette méthode de calcul est inspirée de Geller (1967).

Résultats

Chez le Pleurodèle, Houillon (1956) a établi que les gonocytes sont identifiables de manière certaine, grâce à des critères histologiques, vers le 12ème jour du développement, ce qui correspond au stade 33. En outre, le stock de cellules

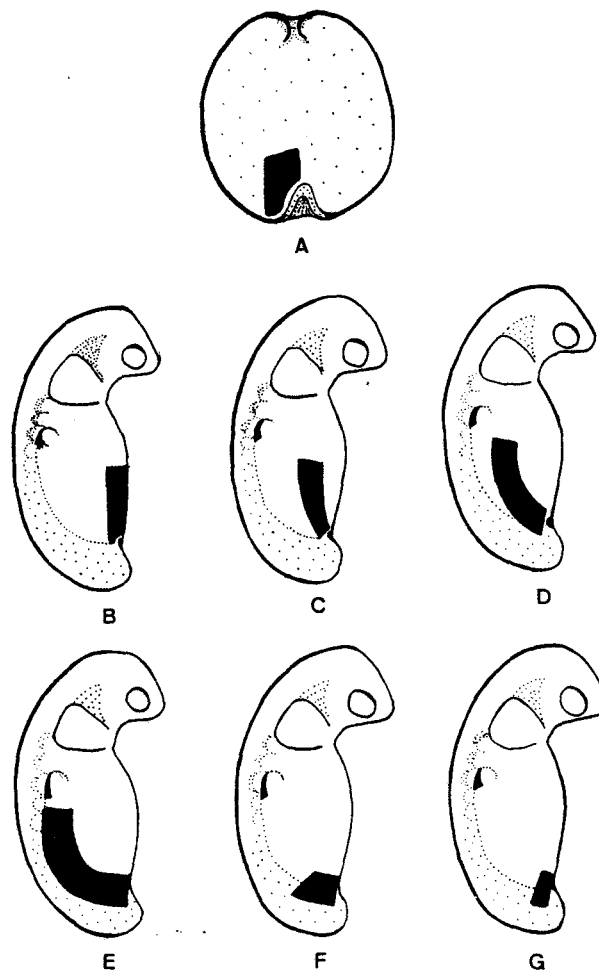


Fig. 1 A—G. Schémas des différents types d'opérations. A Ablation d'ecto-mésoderme ventral au stade neurula. B Ablation d'ecto-mésoderme ventral. C Ablation d'ecto-mésoderme latéro-ventral. D Ablation d'ecto-mésoderme latéral. E Ablation d'ecto-mésoderme intermédiaire. F et G Ablation d'ecto-mésoderme intermédiaire postérieur. B—G Au stade bourgeon caudal

germinales présent à ce stade reste constant chez un individu donné jusqu'à l'âge de 4 semaines, moment où débute la multiplication. C'est sur cette particularité qu'est basée le principe de nos expériences qui est le suivant: toute ablation unilatérale d'un territoire supposé contenir tout ou partie des c.g.p. doit entraîner un déficit du nombre de gonocytes du côté correspondant, sous réserve que la numération soit faite avant l'âge de 4 semaines et qu'il n'y ait pas de régulation.

Nous avons choisi de sacrifier les larves au stade 38 soit 17 jours après la ponte et ceci pour 2 raisons:

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

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

Pour analyser et discuter nos résultats expérimentaux, il était nécessaire de connaître au préalable la répartition des gonocytes entre les crêtes génitales droite et gauche des individus normaux.

I. Etude des animaux témoins

A. Répartition des gonocytes

Cette analyse a été faite sur 22 animaux témoins non opérés provenant de différentes pontes échelonnées au cours de l'année. Outre le caractère embryonnaire de ces cellules, leur noyau plurilobé présente 1 ou 2 nucléoles. Les c.g.p. sont disposées en îlots d'autant plus volumineux que l'on se rapproche du cloaque. Le tableau 1 rend compte de la répartition des gonocytes entre les crêtes génitales droite et gauche.

B. Discussion

L'évaluation exacte du nombre de c.g.p. n'est pas toujours aisée, surtout dans certains îlots très denses; l'approximation peut être évaluée à 10%. Le nombre moyen de 48 gonocytes observé au niveau de chaque crête génitale est proche de celui établi par Houillon (1956); par contre, on note des écarts numériques

Tableau 1. Numération gonocytaire chez les individus témoins

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

Tableau 2. Résultats et signification des expériences d'ablation réalisées aux stades neurula et bourgeon caudal

Numéro de l'expérience	Stade	Type d'opération	Nombre d'opérations	Nombre moyen de gonocytes		Différence $d = m_2 - m_1$	Ecart standard de la différence $t_{0,05} \cdot Sd$	Significatif: + Non significatif: -
				Côté gauche m_2	Côté droit m_1			
1	15	A	26	42	12	30	7	+
2	17	A	10	33	23	10	9,4	+
3	19/20	A	11	31	14	17	6,8	+
4	21	B	14	32	18	14	8,6	+
5	21	D	10	34	31	3	11,9	-
6	22	B	14	51	50	1	18,8	-
7	22	C	8	41	37	4	14,1	-
8	22	D	15	37	10	27	7,5	+
9	22	F	16	31	13	18	8,7	+
10	22	G	22	32	25	7	6	+
11	23	C	12	40	43	3	21,7	-
12	23	D	11	36	28	8	9,7	-
13	24	C	11	44	43	1	15,1	-
14	24	D	9	48	43	5	15,1	-
15	23 et 24	E	21	39	8	31	6	+
16	25	C	10	40	41	1	15,7	-
17	25	D	13	35	42	7	21,6	-
18	27	D	10	51	48	3	17,8	-

importants d'un individu à l'autre, les valeurs extrêmes étant de 32 et 150. Ces cas restent exceptionnels et la moyenne est voisine de 100. Ajoutons enfin que dans la majorité des cas les côtés droit et gauche sont colonisés par un nombre de cellules germinales pratiquement identique: chez 17 individus sur 22 l'écart enregistré est égal ou inférieur à 12.

Cette première analyse aboutit à la conclusion que les gonocytes sont en nombre voisin dans les crêtes génitales droite et gauche mais ce nombre varie d'une larve à l'autre.

II. Etude expérimentale. L'analyse quantitative des résultats est consignée dans le tableau 2

A. Ablations pendant la neurulation

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

1. Jeune neurula (st. 15)

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

mouvement d'extension vers la région antérieure. Les gonocytes ont été dénombrés sur 26 animaux opérés et élevés jusqu'au stade 38. Leurs moyennes s'élèvent à 42 du côté témoin et 12 du côté opéré. La différence d est très supérieure à l'écart standard de la différence (expérience 1 du tableau 2). Chez 3 individus, la crête génitale droite est totalement dépourvue de cellules germinales. Dans les cas où le nombre de gonocytes restant se situe entre 10 et 20 (12 cas sur 26), on remarque que ces cellules sont pour la plupart groupées en un seul îlot situé en position très postérieure. Ceci est en relation, nous semble-t-il, avec la technique opératoire. En effet, quand la limite du territoire enlevé est proche du blastopore il apparaît des anomalies telles que l'hypertrophie, le dédoublement et le déplacement de l'uretère primaire. Il s'est donc avéré nécessaire de conserver la zone voisine du blastopore, ce qui a dû provoquer le maintien de certaines cellules germinales présentes à ce niveau et retrouvées ultérieurement à proximité du cloaque.

2. *Neurula moyenne* (st. 17)

A ce stade l'embryon est âgé de 70 heures et les bourrelets neuraux sont soudés dans la région troncale. L'opération est toujours du type A. Sur les 10 animaux opérés, un seul présente une crête génitale droite stérile. Le déficit rencontré chez les autres animaux semble d'autant plus faible que la moyenne enregistrée du côté témoin est exceptionnellement basse. Il est néanmoins significatif comme le montrent les résultats numériques obtenus (expérience 2 du tableau 2).

3. *Neurula âgée* (st. 19—20)

L'accolement des bourrelets neuraux s'est réalisé dans la région céphalique mais leur soudure est incomplète. Ce stade est atteint vers la 75ème heure après la ponte. Le tableau 2 (expérience 3) fait apparaître des moyennes de 31 et 14; le déficit voisin de 50% est hautement significatif.

En conclusion, il apparaît que l'ablation d'un territoire ecto-mésodermique ventro-latéral aux stades 15, 17 et 19—20 entraîne un déficit significatif des gonocytes. On peut donc assurer que la majeure partie des c.g.p. se situent au voisinage du blastopore dès la fin de la gastrulation.

B. Ablations aux stades du bourgeon caudal

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

1. *Très jeune bourgeon caudal* (st. 21)

Ablation ventrale (type B). Le calcul statistique donne pour $t \cdot Sd$ une valeur de 8,6. La différence ($d = 14$) entre les 2 moyennes traduit l'efficacité réelle de l'intervention (expérience 4).

Les résultats obtenus sont analogues à ceux enregistrés au stade 19—20 pour une intervention pratiquement identique. Dans quelques cas, néanmoins, le

déficit est insignifiant; on pouvait supposer que chez les individus correspondants les cellules germinales avaient amorcé leur migration. Pour vérifier cette supposition nous avons réalisé au même stade des opérations en position plus dorsale.

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

2. Jeune bourgeon caudal (st. 22)

Les ébauches du pronephros et des bourgeons branchiaux sont apparues et font également saillie. Les ablations ventrale (type B) et latéro-ventrale (type C) sont sans effet. Les résultats numériques (expériences 6 et 7 du tableau 2) font apparaître une différence dépourvue de toute signification.

Ablation latérale (type D). Le déficit qui atteint chacun des 15 animaux opérés ($d = 27$) est très supérieur à l'écart standard de la différence. 3 individus présentent une crête génitale droite stérile. Dans la plupart des autres cas les gonocytes sont groupés en un seul îlot. Des précisions complémentaires pouvaient être apportées en restreignant les territoires excisés à la région postérieure de l'embryon. Les ablations de types F et G ont été réalisées dans cette perspective.

Ablation d'ecto-mésoderme intermédiaire (type F). Nous observons du côté opéré un déficit appréciable et hautement significatif ($d = 18$, $t \cdot Sd = 8,7$). Sur 16 individus, seuls 3 présentent un nombre relativement important de gonocytes du côté droit. Dans tous les autres cas, l'opération a entraîné une réduction sensible du nombre de cellules germinales.

Ablation d'ecto-mésoderme intermédiaire (type G). L'excision très localisée s'approche le plus possible du blastopore. Ce type d'opération entraîne encore un déficit certain du côté opéré ($d = 7$, $t \cdot Sd = 6$ mais il est moins significatif que dans le type F précédent. Une partie des gonocytes n'est donc pas affectée par l'intervention, on peut supposer qu'elle a déjà migré en direction dorsale.

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

Les opérations de type C et D n'ont apporté aucun résultat significatif (expériences 11, 12, 13 et 14 du tableau 2).

Ablation de l'ecto-mésoderme intermédiaire (type E). Le territoire excisé, limité dorsalement par la base des somites, s'étend du 7ème somite aux abords du blastopore (expérience 15). 20 larves sur 21 opérées présentent une réduction importante de leur stock de c.g.p. du côté opéré allant jusqu'à la stérilité complète dans 3 cas. L'uretère primaire droit fait défaut depuis le niveau antérieur de l'intervention jusqu'au cloaque, il subsiste néanmoins dans certaines expériences où l'ablation a été incomplète. Le plus souvent les gonocytes rencontrés occupent la base des somites, à l'emplacement normal de l'uretère primaire. On peut assurer qu'aux stades 23 et 24 les c.g.p. se situent dans le mésoderme intermédiaire, en position superficielle, le long de l'uretère primaire.

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

Les opérations réalisées sur le bourgeon caudal âgé confirme l'expérience précédente. Les ablations ventrale et ventro-latérale sont sans effet sur le stock de gonocytes (expériences 16, 17, 18). A titre de contrôle nous avons vérifié l'effi-

capacité de l'ablation de l'ecto-mésoderme intermédiaire au stade 26: à la suite de 3 expériences de ce type nous n'avons retrouvé respectivement que 3, 1 et 5 cellules du côté droit.

Discussion

Les numérations effectuées chez les larves témoins non opérées (tableau 1) mettent en évidence une très grande fluctuation du nombre de gonocytes entre individus d'un même stade. Des constatations analogues ont été faites chez les Amphibiens (Humphrey, 1925), les Oiseaux (Simon, 1960; Fargeix et Theilleux, 1966). Par contre, les moyennes des nombres des cellules germinales situées dans les crêtes génitales droites et gauches sont identiques (48). Ceci nous a incité à réaliser un nombre relativement élevé d'opérations de chaque type et à en apprécier la signification à l'aide de calculs statistiques.

A des stades caractéristiques, des ablations localisées d'ecto-mésoderme entraînent l'absence ou la réduction des gonocytes du côté opéré. Nous confirmons ainsi les résultats antérieurs de l'un de nous (Capuron, 1968) selon lesquels les c.g.p. du Pleurodèle ne peuvent dériver secondairement de cellules somatiques présomptives et sont ainsi dépourvues de toute capacité de régulation. Smith (1964) est parvenu à la même conclusion chez *Ambystoma mexicanum*. Asayama (1950, 1961) et Amanuma (1957) estiment, par contre, qu'une telle possibilité existe chez *Triturus pyrrhogaster* et *Hynobius nebulosus*. Les résultats obtenus par les auteurs japonais ont été discutés dans le travail de Smith (1964) et certaines de nos expériences confirment les arguments avancés par ce dernier. La stérilité complète de la crête génitale correspondant au côté opéré est exceptionnelle, le plus souvent un même type d'ablation se traduit par un déficit plus ou moins important. Après ablation ventrale de type A au stade 15, la diminution de la moyenne des gonocytes est évidente, cependant la stérilité n'est enregistrée que dans 3 cas sur 26. Selon Amanuma (1957), l'opération identique faite chez *Hynobius* est sans effet sur le nombre de gonocytes; mais il est clair qu'un éventuel déficit ne peut plus être apprécié après le début de leur multiplication.

Le tableau 3 récapitule le cheminement des cellules germinales du Pleurodèle au cours de la neurulation et de l'organogenèse. Au stade de la jeune neurula (st. 15), elles sont localisées au voisinage du blastopore en position ventrale et latérale par rapport à ce dernier. Une telle situation a été mise en évidence chez *Ambystoma mexicanum* (Nieuwkoop, 1946; Smith, 1964). Aucun changement ne survient au cours de la neurulation. C'est aux environs du stade 22 (jeune bourgeon caudal) que les cellules germinales quittent leur position initiale pour atteindre le mésoderme intermédiaire aux stades 23—24. La comparaison des résultats exprimés dans le tableau 3 montrent que cette migration s'effectue de la région blastoporale vers le mésoderme intermédiaire le long du trajet de l'uretère primaire. Une marque colorée posée au niveau du mésoderme latéral présomptif d'une gastrula ou d'une jeune neurula suit exactement le même trajet. Cette phase du déplacement peut être considérée comme uniquement passive et s'inscrirait ainsi dans l'ensemble des mouvements de convergence du mésoderme. Dès les stades 25 et 26, les cellules, qui jusqu'à présent étaient restées superficielles, se déplacent vers l'axe de l'embryon en compagnie de l'uretère primaire. Leur élimination complète reste possible à condition de gratter le mésoderme inter-

Tableau 3. Localisation des c.g.p. du stade 15 au stade 27. +++=important; ++=moyen; +=faible; 0=nul. La représentation schématique de cette localisation (—) fait apparaître le passage de ces cellules du mésoderme ventral au mésoderme intermédiaire au stade 22

	Neurula			Bourgeon caudal			
	st. 16	st. 17	st. 19-20	st. 21	st. 22	st. 23-24	st. 25, 26 et 27
Mésoderme ventral	+++	+	++	++	0		
Mésoderme latéro-ventral					0	0	0
Mésoderme latéral				0	+++	0	0
Mésoderme intermédiaire						+++	+++

médiaire en profondeur. Par contre, la transplantation orthotopique de ce mésoderme et des c.g.p. qu'il contient est plus difficilement réalisable, ceci expliquerait que des femelles adultes, ayant reçu au stade 26 des cellules germinales marquées génétiquement, présentent en général un mélange d'ovocytes de type receveur et de type donneur (Lacroix et Capuron, 1966).

La variabilité du nombre de c.g.p. restant après des ablations estimées efficaces peut être imputée aux imprécisions de la technique opératoire et à la nécessité de ne pas léser le blastopore. Elle laisse supposer, en outre, que ces cellules sont assez dispersées au sein du mésoderme et que leur migration s'échelonne dans le temps. Pour pallier les inconvénients de cette démonstration par défaut, nous avons procédé à la culture des territoires supposés contenir les c.g.p., les résultats ainsi obtenus seront publiés ultérieurement.

Bibliographie

- Amanuma, A.: Effect of extirpation of the presumptive intermediate mesoderm upon the differentiation of the primordial germ cells. *Zool. Mag.* **66**, 32—35 (1957). [En Japonais, résumé Anglais.]
- Asayama, S.: The developmental potencies of the intermediate mesoderm of *Triturus pyrrhogaster* when transplanted into orthotopic or heterotopic site in the body wall of another embryo. *J. Inst. Polytech., Osaka City Univ., Ser. D*, **1**, 13—32 (1950).
- Asayama, S.: Potency of lateral plate mesoderm relating to the formation of reproductive tissue. *Zool. Mag.* **70**, 7—11 (1961). [En Japonais, résumé Anglais.]
- Capuron, A.: Analyse expérimentale de l'organogenèse uro-génitale d'embryons induits par la greffe de la lèvre dorsale du blastopore chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. *Ann. Embryol. Morph.* **1**, 3—27 (1968).
- Fargeix, N., Theilleux, D.: Dénombrement des cellules germinales chez des embryons de Canard des stades ligne primitive à 15 paires de somites. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **263**, 59—61 (1966).
- Gallien, L., Durocher, M.: Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii*. *Bull. Biol. Fr. et Belg.* **91**, 97—114 (1957).
- Geller, S.: *A B C de statistique*. Paris: Masson 1967.
- Houillon, Ch.: Recherches expérimentales sur la dissociation medullo-corticale dans l'organogenèse des gonades chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull. Biol. Fr. et Belg.* **90**, 359—445 (1956).

- Humphrey, R. R.: The primordial germ cells of Hemidactylium and other Amphibia. J. Morph. 51, 1—42 (1925).
- Lacroix, J. C., Capuron, A.: Localisation et greffe des cellules germinales primordiales chez *Pleurodeles walitii* Michah (Amphibien Urodèle). Preuves cytogénétiques. C.R. Acad. Sci. (Paris) 263, 1244—1247 (1966).
- Nieuwkoop, P. D.: Experimental investigations on the origin and determination of the germ cells, and on the development of the lateral plates and germ ridges in Urodeles. Arch. neerl. zool. 8, 1—205 (1946).
- Simon, D.: Contribution à l'étude de la circulation et du transport des gonocytes primaires dans les blastodermes d'Oiseau cultivés *in vitro*. Arch. Anat. micr. Morph. exp. 49, 93—176 (1960).
- Smith, L. D.: A test of the capacity of presumptive somatic cells to transform into primordial germ cells in the Mexican Axolotl. J. exp. Zool. 156, 229—242 (1964).

J.-P. Maufroid
A. P. Capuron
Laboratoire d'Embryologie expérimentale
Service de Biologie Animale
Université des Sciences et Techniques
de Lille, B.P. 36
59 Villeneuve d'Ascq, France

PUBLICATION n°2

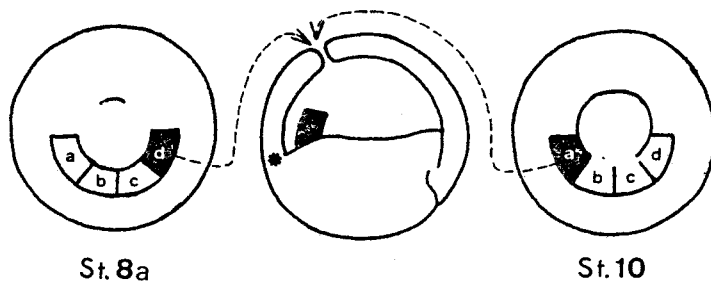
- J.P. MAUFROID et A.P. CAPURON, 1973 : Mise en évidence expérimentale de cellules germinales primordiales dans le mésoderme latéral présomptif de la jeune gastrula de *Pleurodeles Waltlii* (Amphibien Urodèle). C.R. Acad. Sci. Paris, 276, 821-824.

EMBRYOLOGIE EXPÉRIMENTALE. — Mise en évidence expérimentale de cellules germinales dans le mésoderme latéral présomptif de la jeune gastrula de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien Urodèle). Note (*) de MM. Jean-Pierre Maufroid et Alfred Capuron, présentée par M. Louis Gallien.

Des gonocytes se sont différenciés à partir de territoires prélevés au niveau de la zone marginale ventrale et ventro-latérale de la jeune gastrula et implantés isolément dans le blastocèle d'une gastrula hôte. Dès le stade où apparaît l'encoche blastoporale, les cellules germinales du Pleurodèle sont donc situées dans le mésoderme latéral présomptif.

L'un de nous a montré dans une Note précédente ⁽¹⁾ que les cellules germinales primordiales (c. g. p.) de Pleurodèle étaient capables de se différencier à partir de certains tissus isolés et mis en culture au stade du bourgeon caudal. La même technique a permis de localiser avec précision ces cellules au cours de la neurulation et des premiers stades de l'organogenèse (non publié). Par contre elle s'est révélée inefficace à des stades plus précoces : à quelques exceptions près, des gonocytes n'ont pu être décelés dans des cultures *in vitro* de territoires de gastrula. Il nous a semblé que l'implantation de ces territoires dans le blastocèle d'une gastrula fournirait des conditions plus favorables à leur différenciation et à la mise en évidence d'éventuelles cellules germinales. Nos recherches antérieures laissent supposer que chez le Pleurodèle ⁽²⁾, comme chez *Triturus alpestris*, *T. cristatus* ⁽³⁾ et *Ambystoma mexicanum* ⁽⁴⁾, ces cellules sont situées précocement dans le feuillet mésodermique, c'est donc ce dernier qui a fait l'objet des recherches dont les résultats sont rapportés dans le présent travail.

TECHNIQUE OPÉRATOIRE. — La zone marginale ventrale et ventro-latérale d'une gastrula, prélevée aux stades 8 a, 9 et 10 de la table de développement de Gallien et Durocher ⁽⁵⁾, est découpée en 4 secteurs conformément à la figure. Chaque fragment ainsi délimité est introduit dans le blastocèle d'une jeune gastrula. Les individus hôtes sont ensuite élevés séparément dans la solution de Steinberg additionnée de pénicilline jusqu'au stade 38 où ils sont sacrifiés. L'examen histologique est alors effectué selon les méthodes classiques : coupes sériées de 7 μ d'épaisseur et coloration au rouge nucléaire et picro-indigo-carmin.



Représentation des différents secteurs (a, b, c et d) prélevés au niveau de la zone marginale ventrale et ventrolatérale et implantés dans le blastocèle d'une gastrula. ★ localisation des c. g. p. de l'hôte

RÉSULTATS. — Le fragment implanté se localise généralement dans la région moyenne du tronc des hôtes qui réagissent en formant des excroissances plus ou moins ventrales, parfois spectaculaires. A leur niveau, les lames latérales présentent diverses anomalies : dédoublement (*pl.*, *fig.* 1), épaississement, formation d'un mésentère ventral (*pl.*, *fig.* 4). Fréquemment le tissu mésodermique implanté se différencie en cellules mésenchymateuses, en îlot sanguin (*pl.*, *fig.* 5) et provoque une digitation de l'intestin (*pl.*, *fig.* 5) qui peut entrer en contact avec l'épiderme et s'ouvrir à l'extérieur. Enfin au sein de ces structures, se situent presque constamment les éléments recherchés, c'est-à-dire des gonocytes. Ils forment le plus souvent un amas unique, d'importance variable, localisé dans l'un des trois sites suivants :

- la splanchopleure, contre l'intestin (*pl.*, *fig.* 1 et 2),
- un mésentère ventral résultant de la fusion des deux lames latérales (*pl.*, *fig.* 4),
- plus rarement, la somatopleure, sous l'épiderme (*pl.*, *fig.* 3).

En résumé, ces gonocytes constituent un massif toujours entouré par une lame latérale, faisant plus ou moins saillie dans le cœlome comme les crêtes génitales normales. Ils ont été dénombrés dans chacune des larves opérées, les résultats sont rassemblés dans un tableau.

DISCUSSION. CONCLUSION. — Nos résultats démontrent que les c. g. p. sont situées au sein du mésoderme latéral présomptif de la gastrula et ceci dès l'apparition de l'encoche blastoporale (st. 8 a). L'origine mésodermique de ces cellules, mise en évidence par Nieuwkoop chez 2 espèces de *Triturus* ⁽³⁾ et Smith chez l'axolotl ⁽⁴⁾, est ainsi étendue au Pleurodèle ; il est logique de penser que cette origine est commune aux Urodèles.

L'examen du tableau révèle que dans l'ensemble des territoires provenant d'une même gastrula il n'existe pas de secteur privilégié : les c. g. p. sont dispersées dans tout le mésoderme latéral ; Smith a fait la même constatation chez l'axolotl ⁽⁴⁾. Dans la plupart des cas où les 4 secteurs d'un même donneur ont pu être transplantés et analysés, on observe même une répartition disproportionnée entre les moitiés

EXPLICATION DE LA PLANCHE

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

Fig. 1 et 2. — Ilot gonocytaire (g) important dans la paroi péritonéale ventrale du tube digestif (Td), faisant saillie dans la cavité cœlomique (c).

Fig. 3. — Gonocytes situés dans la somatopleure en l'absence de toute réaction visible extérieurement.

Fig. 4. — Présence d'un ilot gonocytaire au niveau d'un mésentère ventral résultant de la fusion des 2 lames latérales.

Fig. 5. — Ilot gonocytaire localisé au voisinage d'une digitation du tube digestif (DTd). Présence d'un volumineux ilot sanguin (Is).

e, épiderme ; Up, uretère primaire.

Les figures 2, 4 et 5 sont à la même échelle.

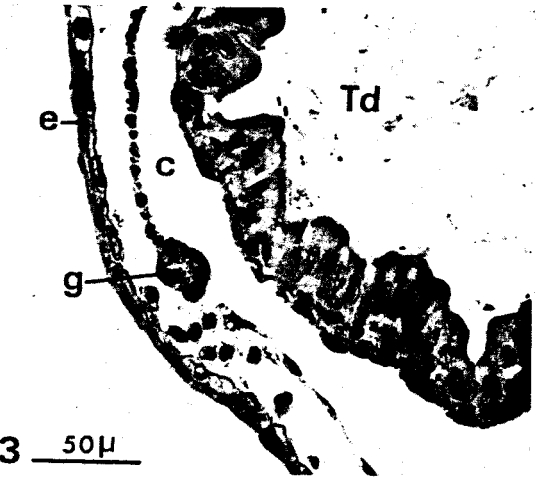
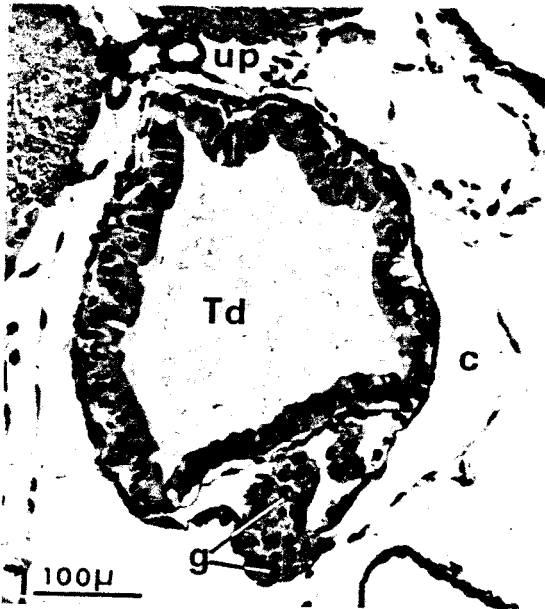


TABLEAU. — *Gonocytes dénombrés chez les larves opérées*

N° d'opération	Secteurs implantés				1/2 gauche (a + b)	1/2 droite (c + d)	Total	Secteurs avec îlots sanguins		
	a	b	c	d						
STADE 8 a.										
Série III :										
A	37	17	8	24	54	32	86			c
B	27	44	—	—	71	—	—			
C	25	60	21	66	85	87	172			
D	44	23	—	—	67	—	—	a		
E	0	61	8	28	61	36	97	a		d
F	35	40	40	49	75	89	164	a	b	d
H	13	2	—	—	15	—	—	a		
Série IV :										
F	5	45	29	19	50	48	98	a	b	c
Série V :										
A	30	18	—	—	48	—	—	a	b	
Série VI :										
A	†	53	54	0	—	54	—			c
E	0	20	—	—	20	—	—			
STADE 9.										
Série I :										
A	36	10	6	20	46	26	72			
C	0	12	24	9	12	33	45	a		c
D	0	45	—	—	45	—	—	a		
E	27	48	†	0	75	—	—	a	b	
F	12	20	—	—	32	—	—			
Série II :										
C	—	—	2	22	—	24	—			c
Série III :										
G	38	28	—	—	66	—	—		b	
Série V :										
B	—	—	0	0	—	0	—			
Série VI :										
B	10	68	0	0	78	0	78	a	b	
C	0	40	9	63	40	72	112			c
Série I :										
B	0	17	5	40	17	45	62			c d
STADE 10.										
Série I :										
G	34	0	14	18	34	32	66	a	b	
Série II :										
A	48	†	0	13	—	13	—	a		c d
F	†	0	0	0	—	0	—		b	c
G	0	13	15	65	13	80	93	a		
H	5	38	0	0	43	0	43	a		
I	0	†	0	12	—	12	—			
Série V :										
C	0	0	0	0	0	0	0		b	
D	0	12	60	4	12	64	76			c

— : Opération non réalisée en raison de difficultés techniques ; † : Animaux morts au cours de l'élevage.



droites et gauches. Aucune convergence de ces cellules vers les secteurs les plus ventraux (*b* et *c*) ne se manifeste entre le début et la fin de la gastrulation (st. 8 *a* à 10). Par contre, les nombres totaux de gonocytes obtenus dans les mêmes conditions sont sensiblement identiques à ceux enregistrés dans les crêtes génitales de larves témoins⁽²⁾.

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

La même remarque s'impose au sujet des îlots sanguins qui apparaissent fréquemment à partir de la même zone marginale conformément aux expériences de culture de Holtfreter⁽⁶⁾. Les érythrocytes se différencient *in situ* sans relation apparente avec les cellules de l'angioblastème situé dans un voisinage immédiat. Le tableau montre en outre que, pour un secteur donné, il n'existe pas d'antagonisme entre la formation des cellules germinales et sanguines.

(*) Séance du 8 janvier 1973.

(1) A. CAPURON, *Comptes rendus*, 274, Série D, 1972, p. 277-279.

(2) J.-P. MAUFROID et A. CAPURON, *Wilhelm Roux' Archiv*, 170, 1972, p. 234-243.

(3) P. D. NIEUWKOOP, *Arch. Neerl. Zool.*, 8, 1946, p. 1-205.

(4) L. D. SMITH, *J. Exp. Zool.*, 156, 1964, p. 229-242.

(5) L. GALLIEN et M. DUROCHER, *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, 91, 1957, p. 97-114.

(6) J. HOLTFRETER, *Wilhelm Roux' Archiv*, 138, 1938, p. 522-656.

Laboratoire d'Embryologie Expérimentale,
Université des Sciences et Techniques,
B. P. n° 36, 59650 Villeneuve-d'Ascq.

BIBLIOGRAPHIE

- AMANUMA A., (1957). Effect of extirpation of the presumptive intermediate mesoderme upon the differentiation of the primordial germ cells. *Zool. Mag.*, 66, 32-35. (En Japonais, résumé Anglais).
- ASASHIMA M., (1975). Inducing effects of the presumptive endoderm of successive stages in *Triturus alpestris*. *Wilhelm Roux' Archiv Entw Mech. Org.*, 177, 301-308.
- ASASHIMA M. et GRUNZ H., (1983). Effects of inducers on inner and outer gastrula ectoderm layers of *Xenopus laevis*. *Differentiation*, 23, 206-212.
- ASAYAMA S., (1950). The developmental potencies of the intermediate mesoderm of *Triturus pyrrhogaster* when transplanted into orthotopic or heterotopic site in the body wall of another embryo. *J. Inst. Polytech., Osaka City Univ., Ser. D*, 1, 13-32.
- ASAYAMA S., (1961). Potency of lateral plate mesoderm relating to the formation of reproductive tissue. *Zool. Mag.*, 70, 7-11 (En Japonais, résumé anglais).
- ASAYAMA S. et AMANUMA A., (1957). On the primordial germ cells of the secondary embryo induced by the organizer., *Zool. Mag.* 66, 279-283. (En Japonais, résumé Anglais).
- BALINSKY B.I., (1966). Changes in the ultrastructure of amphibian eggs following fertilization. *Acta Embryol. Morph. exp.*, 9, 132-154.
- BARTH L.G. et BARTH L.J., (1959). Differentiation of cells of the *Rana pipiens* gastrula in unconditioned medium. *J. Embryol. exp. Morph.*, 7, 210-222.
- BERNFELD M.R. et WESSELLS N.K., (1970). Intra-and extracellular control of epithelial morphogenesis. *Develop. Biol.*, 4 (Suppl.) : 195
- BOTERENBROOD E.C. et NIEUWKOOP P.D., (1973). The formation of the mesoderm in Urodelean Amphibians. V. Its regional induction by the endoderm. *Wilhelm Roux'Archiv.*, 173, 319-332.
- BOUNOURE L., (1927). Le chondriome des gonocytes primaires chez *Rana temporaria* et la recherche des éléments génitaux aux jeunes stades du développement. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 185, 1304-1306.

- BOUNOURE L., (1931). Sur l'existence d'un déterminant germinal dans l'oeuf indivis de la Grenouille rousse. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, **193**, 402-404.
- BOUNOURE L., (1934). Recherches sur la lignée germinale chez la Grenouille rousse aux premiers stades du développement. *Ann. Sci. Nat., 10e ser.*, **17**, 67-248.
- CAPURON A., (1968). Analyse expérimentale de l'organogenèse uro-génitale d'embryons induits par la greffe de la lèvre dorsale du blastopore chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. *Ann. Embryol. Morph.*, **1**, 3-27.
- CAPURON A. et MAUFROID J.P., (1981). Rôle de l'endoderme dans la détermination du mésoderme ventro-latéral et des cellules germinales primordiales chez *Pleurodeles Waltlii*. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, **70** (4), 219-226.
- CZOLOWSKA R., (1972). The fine structure of the "germinal cytoplasm" in the egg of *Xenopus laevis*. *Wilhelm Roux' Arch. Entw. Mech. org.*, **169**, 335-344.
- DEUCHAR E.M., (1967). "Inducing activity in extracts from *Xenopus* embryos and from isolated dorsal lips". *J. Embryol. exp. Morph.*, **17**, 341-348.
- DIXON, K.E., (1981). The origin of the primordial germ cells in the Amphibia. *Netherlands J. of Zoology*. **31** (1), 5-37.
- DUPRAT A.M., GUALANDRIS L. et ROUGE P., (1982). Neural induction and the structure of the target cell surface. *J. Embryol. exp. Morph.*, **70**, 171-187.
- EDDY E.M., (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.*, **43**, 229-280.
- FAULHABER I., (1970a). Anreicherung des vegetalisierenden induktionsfaktors aus der gastrula des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) und abgrenzung des molekulargewichtsbereiches durch gradientenzentrifugation. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.*, **351**, 588-594.
- FAULHABER I., (1972). Die induktionsleistung subzellularer fraktionen aus der gastrula von *Xenopus laevis*. *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org.*, **171**, 87-108.
- FORMAN D. et SLACK J.M.W., (1980). Determination and cellular commitment in the embryonic Amphibian mesoderm. *Nature*, **286**, 492-494.

- GALLIEN L., (1952). Elevage et comportement du Pleurodèle au laboratoire. *Bull. Soc. Zool. France*, **77**, 456-461.
- GIPOULOUX J.D., (1975). "Cytoplasme germinal" et détermination germinale chez les amphibiens Anoures. *Ann. Biol.*, **14**, 475-487.
- GALLIEN L. et DUROCHER M., (1957). Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, **91**, 97-114.
- GROBSTEIN C., (1953). Morphogenetic interaction between embryonic Mouse tissues separated by a membrane filter. *Nature, Lond.*, **172**, 869-871.
- GROBSTEIN C., (1955). Inductive interactions in the development of the Mouse métanephros. *J. exp. Zool.*, **130**, 319-340.
- GRUNZ H., (1977). Differentiation of the four animal and the four vegetal blastomeres of the eight-cell-stage of *Triturus alpestris*. *Wilhelm Roux's Archives.*, **181**, 267-277.
- GRUNZ H., (1983). Change in the differentiation pattern of *Xenopus laevis* ectoderme by variation of the incubation time and concentration of vegetalizing factor. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **192**, 130-137.
- GRUNZ H. et TACKE L., (1986). The inducing capacity of the presumptive endoderm of *Xenopus laevis* studied by transfilter experiments. *Roux's Arch. dev. Biol.*, **195**, 467-473.
- GUMPEL-PINOT M., (1980). Ectoderm and mesoderm interactions in the limb bud of the Chick embryo studied by transfilter cultures, cartilage differentiation and ultrastructural observations. *J. Embryol. exp. Morph.*, **59**, 157-173. .
- GUMPEL-PINOT M., (1981). Ectoderm - mesoderm interactions in relation to limb bud chondrogenesis in the Chick embryo : transfilter culture and ultrastructural studies. *J. Embryol. exp. Morph.*, **65**, 73-87.
- HAMASIMA N. et KOTANI M., (1977). Ultrastructural observations on the primordial germ cells in the Newt, *Triturus pyrrhogaster*. *Zool. Mag.*, **86**, 239-245.
- HAMBURGER V., (1947). A manual of experimental Embryology. The University of Chicago Press (Chicago, Illinois).
- HAY E.D. et MEIER S., (1976). Stimulation of corneal differentiation by interaction between cell surface and extracellular matrix. II. Further studies on the nature and site of transfilter induction. *Develop. Biol.*, **52**, 141-157.

- HOLTFRETER H.B., (1965). Differentiation capacities of Spemann's organizer investigated in explants of diminishing size. The University of Rochester, Rochester, New-York, thesis.
- HOLTFRETER J., (1933). Nachweis der Induktionsfähigkeit abgetöteter Keimteile. Isolations - und Transplantationsversuche. *Archiv Entw Mech. Org.*, **128**, 584-633.
- HOLTFRETER J., (1936). Regionale Induktionen in xenoplastisch zusammengesetzten Explantaten. *Archiv. Entw Mech. org.*, **134**, 466-550.
- HOLTFRETER J., (1938a). Veränderungen der Reaktionsweise im alternden isolierten Gastrulaektoderm. *Archiv. Entw Mech. Org.*, **138**, 163-196.
- HOLTFRETER J., (1938b). Differenzierungspotenzen isolierter Teile der Urodelengastrula. *Archiv. Entw Mech. org.*, **138**, 522-656.
- HOLTFRETER J., (1955). Studies on the diffusibility, toxicity and pathogenic properties of "inductive" agents derived from dead tissues. *Exp. Cell. Res, Suppl.* **3**, 188-209.
- HOUILLON C., (1956). Recherches expérimentales sur la dissociation medullo corticale dans l'organogenèse des gonades chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, **90**, 359-445.
- HUMPHREY R.R., (1925). The primordial germ-cells of *Hemidactylum* and other Amphibia. *J. Morph. Phys.*, **41**, 1-43.
- HUMPHREY R.R., (1927). Extirpation of the primordial germ cells of *Amblystoma* : its effect upon the development of the gonad. *J. exp. Zool.*, **49**, 363-399.
- HUMPHREY R.R., (1928). The developmental potencies of the intermediate mesoderm of *Amblystoma* when transplanted into ventrolateral sites on other embryos : the primordial germ cells of such grafts and their role in the development of a gonad. *Anat. Record*, **40**, 67-102.
- IKENISHI K. et KOTANI M., (1975). Ultrastructure of the "germinal plasm" in *Xenopus* embryos after cleavage. *Develop. Growth Differ.*, **17**, 101-110.
- IKENISHI K. et NIEUWKOOP P.D., (1978). Location and ultrastructure of primordial germ cells (PGCs) in *Ambystoma mexicanum*. *Develop. Growth. Differ.*, **20**, 1-9.

- JANECZEK J., JOHN M., BORN J., TIEDEMANN H. et TIEDEMANN H., (1984). Inducing activity of subcellular fractions from Amphibian embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **193**, 1-12.
- JOHNEN A.G., (1956a). Experimental studies about the temporal relation-ships in the induction process. I. Experiments on *Amblystoma mexicanum*. *Proc. Acad. Sci. Amst., ser. C.*, **59**, 554-561.
- JOHNEN A.G., (1956b). Experimental studies about the temporal relation-ships in the induction process. II. Experiments on *Triturus vulgaris*. *Proc. Acad. Sci. Amst., ser. C.*, **59**, 652-660.
- JOHNEN A.G., (1961). Experimentelle Untersuchungen über die Bedeutung des Zeitfaktors beim Vorgang der neuralen Induktion. *Arch. Entw. Mech. Org.*, **153**, 1-13.
- KAGEURA H. et YAMANA K., (1983). Pattern formation in isolated halves and blastomeres of early *Xenopus laevis*. *J. Embryol. exp. Morph.*, **74**, 221-234.
- KAGEURA H. et YAMANA K., (1984). Pattern regulation in defect embryos of *Xenopus laevis*. *Develop. Biol.*, **101**, 410-415.
- KAGEURA H. et YAMANA K., (1986). Pattern formation in 8-cell composite embryos of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. exp. Morph.*, **91**, 79-100.
- KALT M.R., (1973). Ultrastructural observations on the germ line of *Xenopus laevis*. *Z. Zellforsch.*, **138**, 41-62.
- KARKINEN- JAASKELAINEN M., (1978). Transfilter lens induction in Avian embryos. *Differentiation*, **12**, 31-37.
- KAWAKAMI I., (1976). Fish swimbladder : an excellent mesodermal inductor in primary embryonic induction. *J. Embryol. exp. Morph.*, **36**, 315-320.
- KAWAKAMI I., SASAKI N., SATO A. et OSAKO N., (1978). Vegetalization of presumptive ectoderm of Newt gastrulae in a transfilter experiment with Fish swimbladder as the inductor. *Develop. Growth and Differ.*, **20** (4), 353- 361.
- KOCHER-BECKER U. et TIEDEMANN H., (1971). Induction of mesodermal and endodermal structures and primordial germ cells in *Triturus* ectoderm by a vegetalizing factor from Chick embryos. *Nature (London)*, **233**, 65-66.

- KOTANI M., (1957). On the formation of the primordial germ cells from the presumptive ectoderm of *Triturus gastrulae*. *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ., Ser. D*, **8**, 145-158.
- KOTANI M., (1958). The formation of germ cells after extirpation of the presumptive lateral mesoderm of *Triturus gastrulae*. *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ., Ser. D*, **9**, 195-209.
- MAHOWALD A.P. et HENNEN S., (1971). Ultrastructure of the "germ plasm" in eggs and embryos of *Rana pipiens*. *Develop. Biol.*, **24**, 37-53.
- MASUI Y., (1961). Mesodermal and endodermal differentiation of the presumptive ectoderm of *Triturus gastrula* through influence of lithium ions. *Experientia*, **17**, 458-459.
- MAUFROID J.P. et CAPURON A., (1972). Migration des cellules germinales primordiales chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. *Wilhelm Roux' Arch. Entw Mech. Org.*, **170**, 234-243.
- MAUFROID J.P. et CAPURON A., (1973). Mise en évidence expérimentale de cellules germinales dans le mésoderme latéral présomptif de la jeune gastrula de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien Urodèle). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **276**, 821-824.
- MAUFROID J.P. et CAPURON A., (1977). Induction du mésoderme et des cellules germinales primordiales par l'endoderme chez *Pleurodeles waltlii* (Amphibien, Urodèle): évolution au cours de la gastrulation. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **284**, 1713-1716.
- MICHAEL P., (1984). Are the primordial germ cells (PGCs) in Urodela formed by the inductive action of the vegetative yolk mass? *Develop. Biol.*, **103**, 109-116.
- MINUTH M. et GRUNZ H., (1980). The formation of mesodermal derivatives after induction with vegetalizing factor depends on secondary cell interactions. *Cell Differentiation*, **9**, 229-238.
- MINUTH W.W., (1978). Mesodermalization of Amphibian gastrula ectoderm in transfilter experiments. *Medical Biology*, **56**, 349-354.
- MIURA Y. et WILT F., (1969). Tissue interaction and the formation of the first erythroblasts of the Chick embryo. *Develop. Biol.*, **19**, 201-211.
- NAKAMURA O. et MATSUZAWA T., (1967). Differentiation capacity of the marginal zone in the morula and blastula of *Triturus pyrrhogaster*. *Embryologia*, **9** 223-237.

- NAKAMURA O. et TAKASAKI H., (1970). Further studies on the differentiation capacity of the dorsal marginal zone in the morula of *Triturus pyrrhogaster*. *Proc. Japan Acad.*, **46**, 546-551.
- NAKAMURA O., TAKASAKI H. et MIZOHATA T., (1970). Differentiation during cleavage in *Xenopus laevis*. I. Acquisition of self-differentiation capacity of the dorsal marginal zone. *Proc. Japan Acad.*, **46**, 694-699.
- NAKAMURA O., TAKASAKI H. et ISHIHARA M., (1971). Formation of the organizer from combinations of presumptive ectoderm and endoderm. I. *Proc. Japan Acad.*, **47**, 313-318.
- NIEUWKOOP P.D., (1947). Experimental investigations on the origin and determination of the germ cells, and on the development of the lateral plates and germ ridges in the Urodeles. *Arch. Neer. Zool.*, **8**, 1-205.
- NIEUWKOOP P.D., (1969a). The formation of the mesoderm in Urodelean Amphibians. I. Induction by the endoderm. *Wilhelm Roux' Arch. Entw. Mech. Org.*, **162**, 341-373.
- NIEUWKOOP P.D., (1969b). The formation of the mesoderm in Urodelean Amphibians. II. The origin of the dorso-ventral polarity of the mesoderm. *Wilhelm Roux' Arch. Entw. Mech. Org.*, **163**, 298-315.
- NIEUWKOOP P.D. et SUTASURYA L.A. (1979). Primordial germ cells in the Chordates. Edit. Cambridge University Press. 1-187.
- NIEUWKOOP P.D. et UBBELS G.A., (1972). The formation of the mesoderm in Urodelean Amphibians. IV. Qualitative evidence for the purely 'ectodermal' origin of the entire mesoderm and of the pharyngeal endoderm. *Wilhelm Roux' Arch. Entw. Mech. Org.*, **169**, 185-199.
- OGI K., (1961). Vegetalization of the presumptive ectoderm of the *Triturus* gastrula by exposure to lithium chloride solution. *Embryologia*, **5**, 384-396.
- OGI K., (1967). Determination in the development of the Amphibian embryo. *Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV (Biol.)*, **33**, 239-247.
- OGI K., (1969). Regulative capacity in the early Amphibian embryo. *Res. Bull. Gen. Nagoya Univ.*, **13**, 31-40.
- RUGH R., (1948). Experimental embryology. A manual of techniques and procedures. Edit. rev., Burgess publishing Company, Minneapolis, Minnesota.

- RUUD G., (1925). Die Entwicklung isolierter Keimfragmente frühester Stadien von Triton *taeniatus*. *Wilhelm Roux' Archiv. Entw Mech. Org.*, **105**, 209-293.
- SAXEN L., (1961). Transfilter neural induction of Amphibian ectoderm. *Devel. Biol.*, **3**, 140-152.
- SAXEN L., (1985). Alternative implementation mechanisms of embryonic induction. Molecular determinants of animals form. Edit. Alan R. Liss, Inc., 1-13.
- SAXEN L. et LEHTONEN E., (1978). Transfilter induction of kidney tubules as a function of the extent and duration of intercellular contacts. *J. Embryol. exp. Morph.*, **47**, 97-109.
- SAXEN L., LEHTONEN E., KARKINEN-JAASKELAINEN M., NORDLING S. et WARTIOVAARA J., (1976). Are morphogenetic tissue interactions mediated by transmissible signal substances or through cell contacts? *Nature, London*, **259**, 662-663.
- SAXEN L. et TOIVONEN S., (1962). Primary embryonic induction. Academic Press, London, 1-271.
- SCHRECKENBERG G.M. et JACOBSON A.G., (1975). Normal stages of development of the Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Develop. Biol.*, **42**, 391-400.
- SMITH J.C., (1987). A mesoderm-inducing factor is produced by a *Xenopus* cell line. *Development*, **99**, 3-14.
- SMITH J.C., DALE L. et SLACK J.M.W., (1985). Cell lineage labels and region-specific markers in the analysis of the inductive interactions. *J. Embryol. exp. Morph.*, **89**, suppl., 317-331.
- SMITH L. et THOROGOOD P., (1983). Transfilter studies on the mechanism of epithelio-mesenchymal interaction leading to chondrogenic differentiation of neural crest cells. *J. Embryol. exp. Morph.*, **75**, 165-188.
- SMITH L.D., (1964). A test of the capacity of presumptive somatic cells to transform into primordial germ cells in the mexican Axolotl. *J. exp. Zool.*, **156**, 229-242.
- SMITH L.D. MICHAEL P. et WILLIAMS M.A., (1983). Does a predetermined germ line exist in Amphibians? Current Problems in germ cell differentiation, 20-39.

- SUDARWATI S., (1973). Mesodermal competence of the presumptive ecto-neuroderm at various developmental stages, in *Xenopus laevis* (Daudin). *Proccedings ITB*, **7**, 17-26.
- SUDARWATI S. et NIEUWKOOP P.D., (1971). Mesoderm formation in the Anuran *Xenopus laevis* (Daudin). *Wilhelm Roux' Arch. Entw Mech. Org.*, **166**, 189-204.
- SUTASURYA L.A. et NIEUWKOOP P.D., (1974). The induction of the primordial germ cells in the Urodeles. *Wilhelm Roux' Arch. Entw Mech. Org.*, **175**, 199-220.
- TAKAMOTO K., (1953). The development of entoderm free embryo. *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ.*, **4**, 51-60.
- THESLEFF I. LEHTONEN E. WARTIOVAARA J. et SAXEN L., (1977). Interference of tooth differentiation with interposed filters. *Develop. Biol.*, **58**, 197-203.
- TIEDEMANN H. et TIEDEMANN H., (1959). Versuche zur Gewinnung eines Mesodermalen Induktionsstoffes aus Huhnerembryonen. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, **314**, 156-176.
- TOIVONEN S., (1953). Bone-marrow of the Guinea-pig as a mesodermal inductor in implantation experiments with embryos of *Triturus*. *J. Embryol. exp. Morph.*, **1**, 97-104.
- TOIVONEN S., (1979). Transmission problem in primary induction. *Differentiation*, **15**, 177-181.
- TOIVONEN S., TARIN D., et SAXEN L., (1976). The transmission of morphogenetic signals from Amphibian mesoderm to ectoderm in primary induction. *Differentiation*, **5**, 49-55.
- TOIVONEN S., TARIN D., SAXEN L., TARIN P.J. et WARTIOVAARA J., (1975). Transfilter studies on neural induction in the Newt. *Differentiation*, **4**, 1-7.
- TOIVONEN S. et WARTIOVAARA J., (1976). Mechanisms of cell interaction during primary embryonic induction studied in transfilter experiments. *Differentiation*, **5**, 61-66.
- VINTEMBERGER P., (1934). Résultats de l'autodifférentiation des 4 macromères isolés au stade de huit blastomères dans l'oeuf d'un Amphibien Anoure. *C. R. Soc. Biol.*, **117**, 693-696.

- VINTEMBERGER P., (1935). Sur les résultats du développement des 4 micromères isolés au stade de 8 blastomères dans l'oeuf d'un Amphibien Anoure. *C. R. Soc. Biol.*, **118**, 52-53.
- VINTEMBERGER P., (1936) . Sur le développement comparé des micromères de l'oeuf de *Rana fusca* divisé en 8 : a) après isolement , b) après transplantation sur un socle de cellules vitellines . *C. R. Soc. Biol.*, **122** , 927-930 .
- WARTIOVAARA J., NORDLING S., LEHTONEN E. et SAXEN L. (1974). Transfilter induction of kidney tubules : correlation with cytoplasmic penetration into Nucleopore filters. *J. Embryol. exp. Morph.*, **31**, 667-682.
- WEISS P., (1947). The problem of specificity in growth and development. *Yale J. Biol. Med.* ,**19**, 235-278.
- WEISS P., (1958). Cell contact. *Int. Rev. Cytol.*, **7**, 391-423.
- WILLIAMS M.A. et SMITH L.D., (1971). Ultrastructure of the "germinal plasm" during maturation and early cleavage in *Rana pipiens*. *Develop. Biol.*, **25**, 568-580.
- YAMADA T., (1950). Dorsalization of the ventral marginal zone of the *Triturus* gastrula. *Biol. r. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole*, **98**, 98-121.
- YAMADA T., (1961). A chemical approach to the problem of the organizer. In : Abercrombie M., Brachet J. (Eds) *Adv. Morphogen.* **1** : 1-53, Academic Press, New-York, London.

PLANCHE I

MISE EN EVIDENCE DES C.G.P. DANS DIVERSES SITUATIONS NATURELLES OU EXPERIMENTALES.

Les flèches indiquent l'emplacement des c.g.p.

Fig. A et B : Localisation des c.g.p. dans les crêtes génitales d'une larve non opérée fixée au st. 38.

Les c.g.p. sont situées le long des uretères primaires (up), leur noyau au contour plurilobé renferme 1 ou 2 nucléoles. Leur cytoplasme contient de volumineuses plaquettes vitellines. (A : x 320 ; B : x 730).

Fig. C : Différenciation de c.g.p. après culture *in vitro* d'un fragment ecto-mésodermique prélevé au stade neurula.

Les c.g.p. sont groupées en îlot au sein du mésenchyme, on remarque la présence de fines granulations dans le cytoplasme. (C : x 730).

Fig. D et E : Réactions obtenues à l'état larvaire après implantation dans le blastocoele de gastrula d'un fragment de mésoderme latéral présomptif.

Les c.g.p. sont localisées dans l'un des 2 sites suivants :

- la splachnopleure, contre l'intestin (Fig. D : x 210),
- un mésentère ventral résultant de la fusion des 2 lames latérales (Fig. E : x 100).

c, coelome ; ch, chorde ; e, épiderme ; my, myotomes ; td, tube digestif.

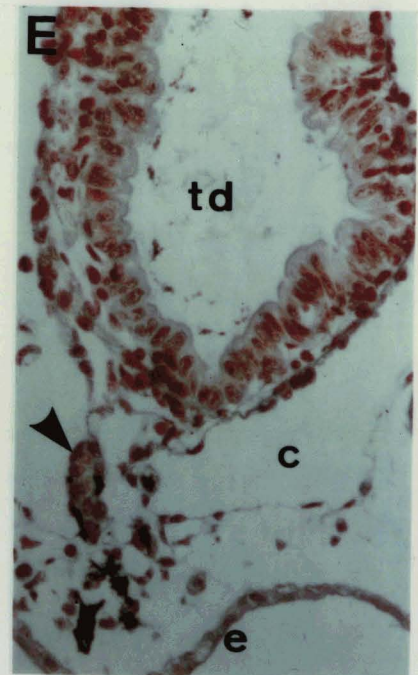
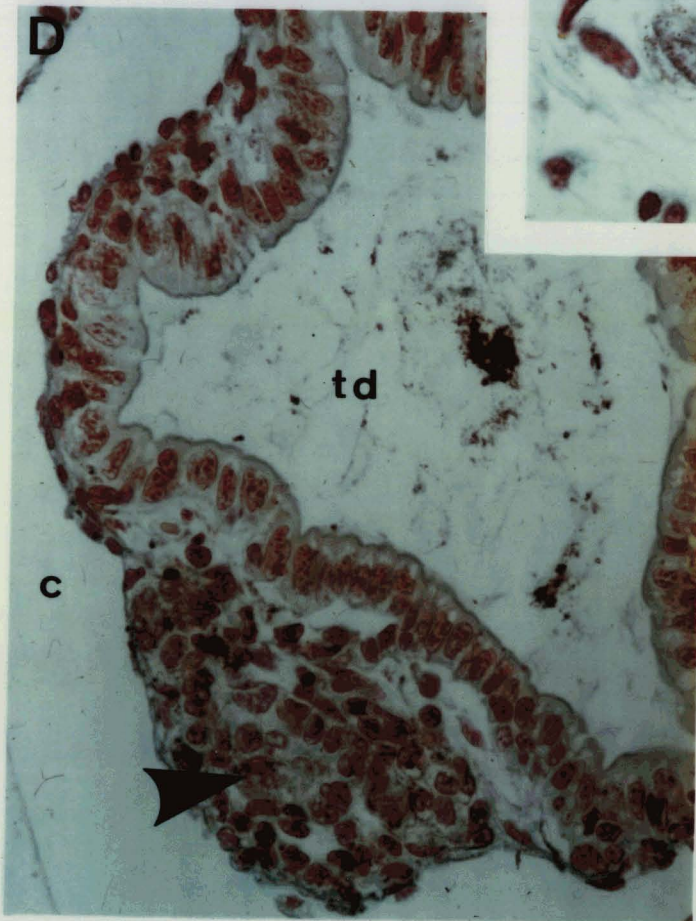
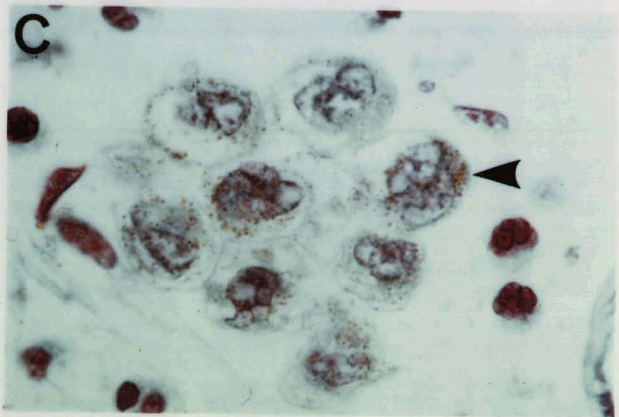
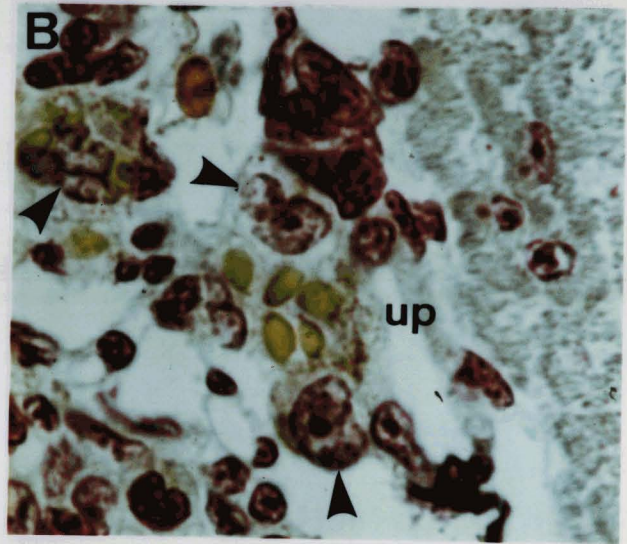
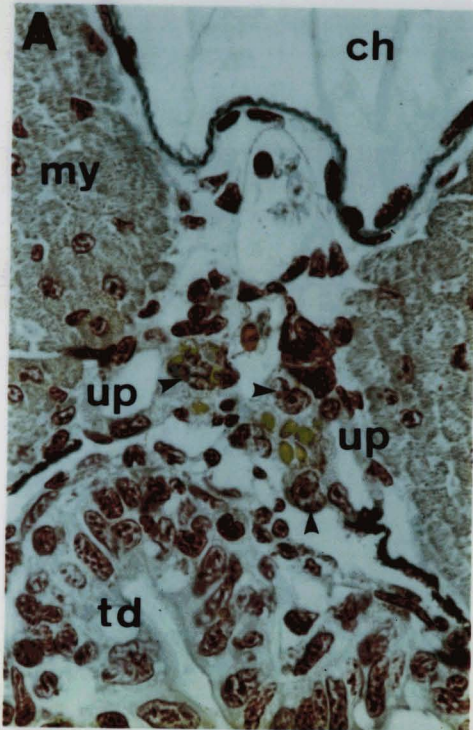


PLANCHE II

ETUDE HISTOLOGIQUE DES PRESTATIONS FOURNIES PAR LA CULTURE EN SANDWICH DE MESODERME LATERAL PRESOMPTIF PRELEVE A DIFFERENTS STADES DE LA GASTRULATION.

Fig. A et B : Aspect général des prestations issues de la culture de mésoderme latéral isolé au stade 8a (jeune gastrula).
Les explants se sont différenciés en vésicules limitées par une mince enveloppe épidermique (e), doublée intérieurement par du mésenchyme (m).
Un mésothélium (me) entoure une vaste cavité coelomique. (A et B : x 81,25).

Fig. C, D, E et F : Aspect des prestations lorsque le mésoderme latéral est découpé au stade 12 (gastrula âgée).
Les vésicules renferment en plus des structures mésodermiques décrites dans les figures A et B des c.g.p. (flèches). Les cellules se regroupent en îlots localisés, soit dans une travée mésenchymateuse (tm), soit contre un tubule néphrétique (tn). (C et E : x 81,25 ; D et F : x 325).

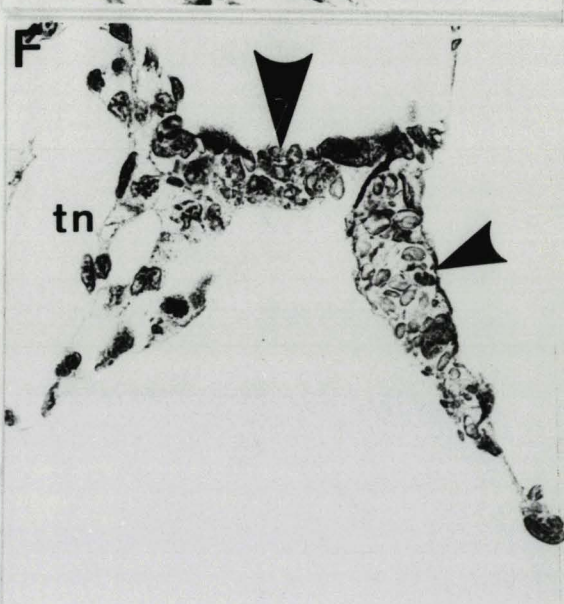
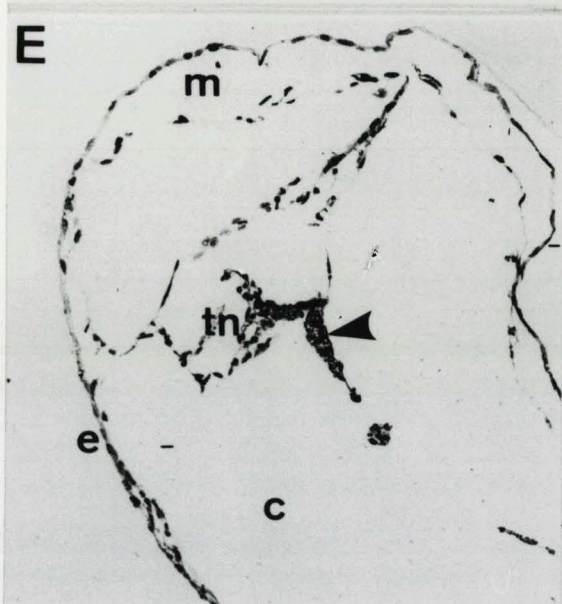
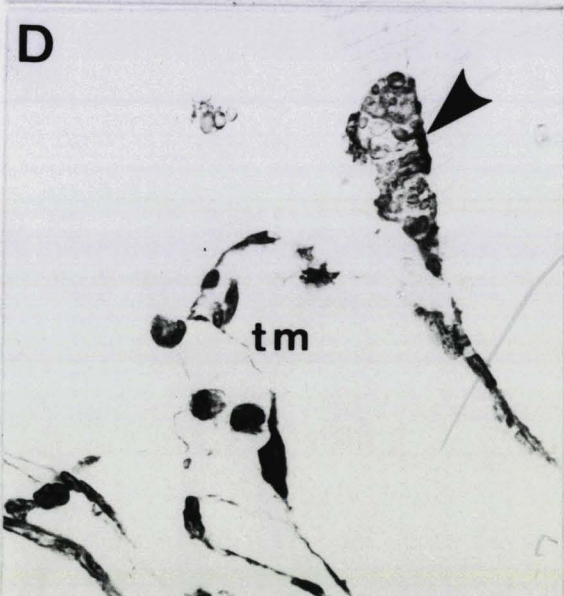
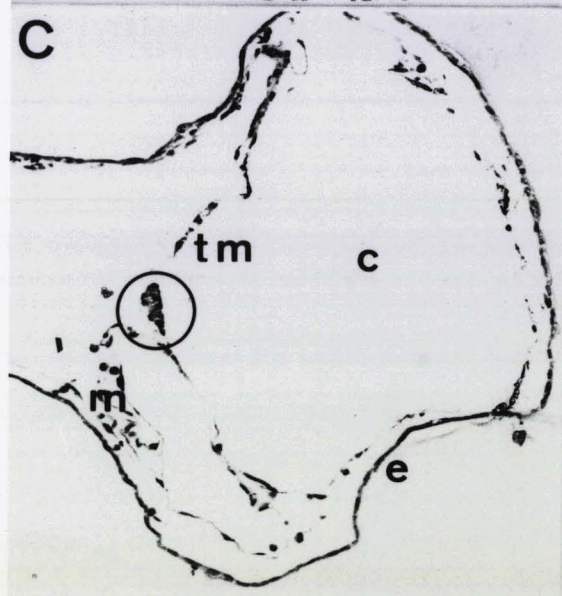
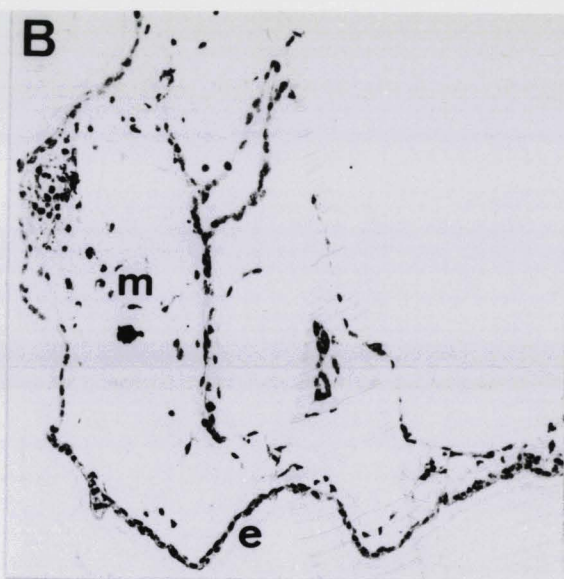
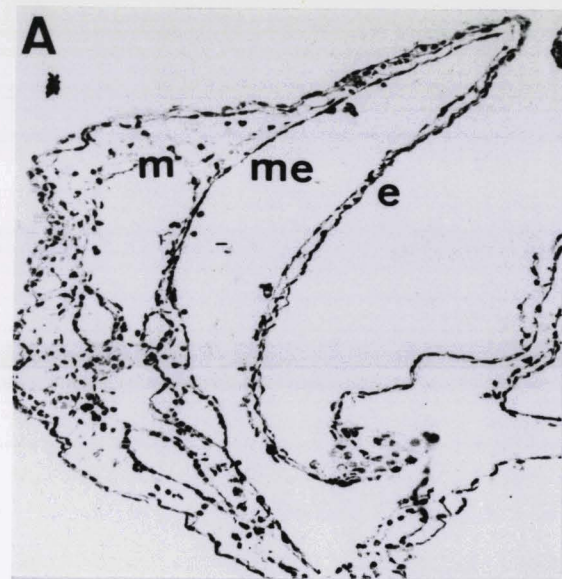


PLANCHE III

PRESTATIONS FOURNIES PAR LA MISE EN CULTURE EN SANDWICH DE SECTEURS DE LA ZONE MARGINALE DECOUPES AU STADE BLASTULA MOYENNE (STADE 6).

Fig. A et B : Aspect morphologique des prestations.

Fig. A : Le secteur issu de la zone marginale dorsale (ZMD) évolue en une vésicule présentant une symétrie dorso-ventrale très apparente.
d, face dorsale ; v, face ventrale.

Fig. B : Le secteur issu de la zone marginale ventrale (ZMV) donne naissance à une vésicule ovoïde sans organisation particulière (A et B : x 15).

Fig. C, D, E et F : Aspect microscopique des prestations.

Fig. C : Le fragment prélevé au niveau de la ZMV se différencie en une vésicule limitée par une enveloppe épidermique (e), tapissée intérieurement par du mésenchyme (m). Un mésothélium (me) délimite une vaste cavité centrale. Les c.g.p. (flèche) sont groupées en un seul îlot enveloppé dans une travée de mésenchyme (C : x 81,25).

Fig. D : Vue de détail de la figure C. La flèche indique l'emplacement des c.g.p. (D : x 325).

Fig. E et F : Les explants issus de la ZMD possèdent un haut degré d'organisation. On reconnaît les structures dorsales habituelles : tube neural (tn), chorde (ch) et myotomes (my). On observe parfois des capsules otiques (co) situées de part et d'autre du tube neural (E et F : x 81,25).

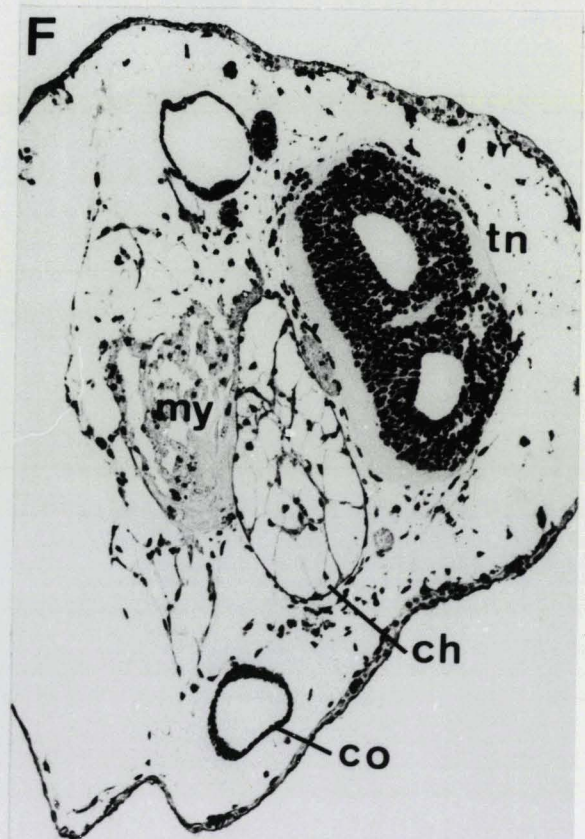
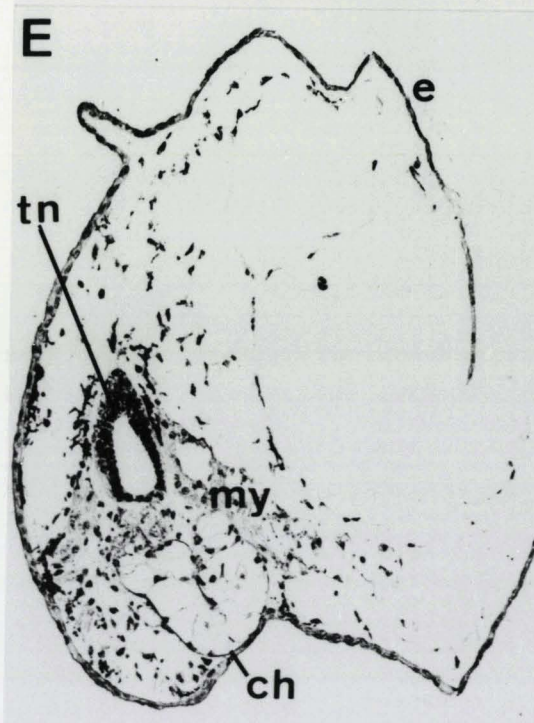
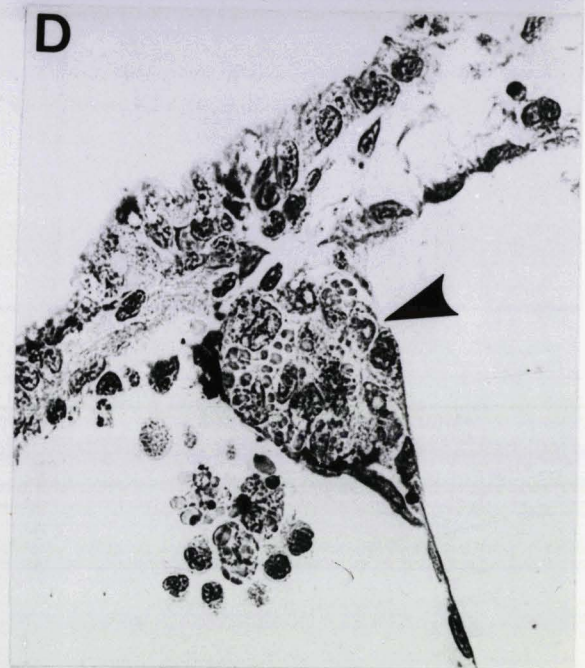
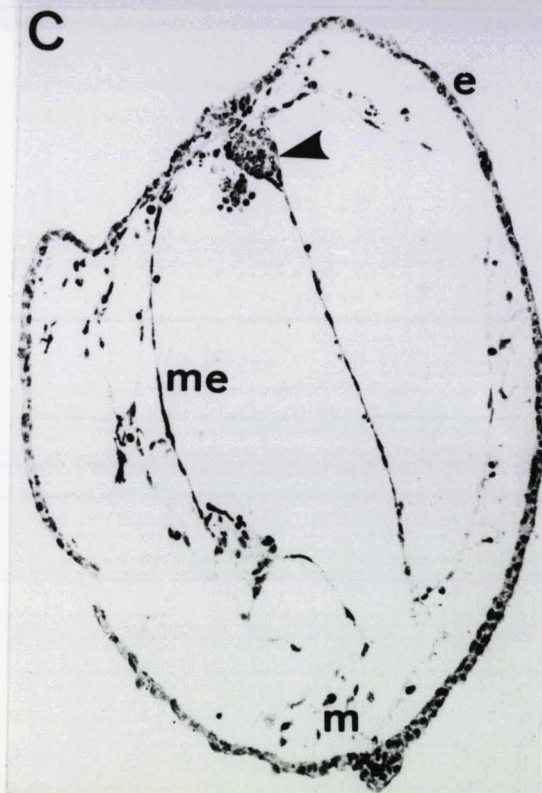
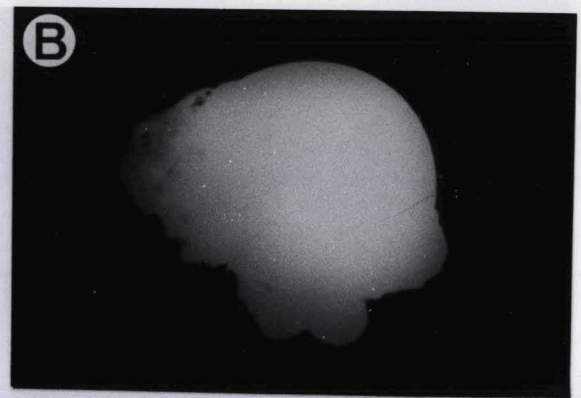
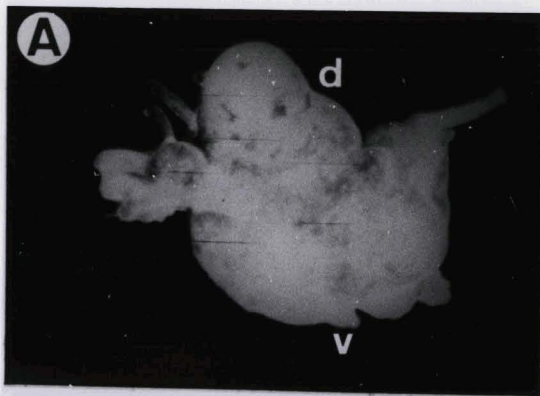


PLANCHE IV

PRESTATIONS FOURNIES PAR LA MISE EN CULTURE EN SANDWICH DE SECTEURS DE LA ZONE MARGINALE DECOUPES AU STADE JEUNE BLASTULA (STADE 5).

Fig. A et B : Aspect morphologique des prestations .

Fig. A : Prestation issue de la culture d'un fragment de la zone marginale dorsale (ZMD).

Fig. B : Prestation issue de la culture d'un fragment de la zone marginale ventrale (ZMV).

Dans les 2 cas on ne remarque pas de différences apparentes dans l'organisation générale des vésicules obtenues (A et B : x 15).

Fig. C, D, E et F : Aspect microscopique des prestations.

Fig. C : La vésicule issue de la culture d'un fragment de la ZMV renferme peu de structures mésodermiques, la présence de plaquettes vitellines indique une différenciation incomplète. Dans quelques cas des c.g.p. ont été observées au sein du mésenchyme périphérique (flèche) (C : x 81,25).

Fig. D : Vue de détail de l'îlot de c.g.p. décrit dans la figure C (D : x 520).

Fig. E et F : Les prestations obtenues après culture de secteurs dorsaux de la zone marginale présentent des dérivés mésodermiques plus variés et abondants. On reconnaît une certaine organisation dorso-ventrale dans l'explant : une chorde (ch), un tube neural (tn) et des myotomes (my) occupent la plus grande partie de la vésicule. m, mésenchyme (E et F : x 81,25).

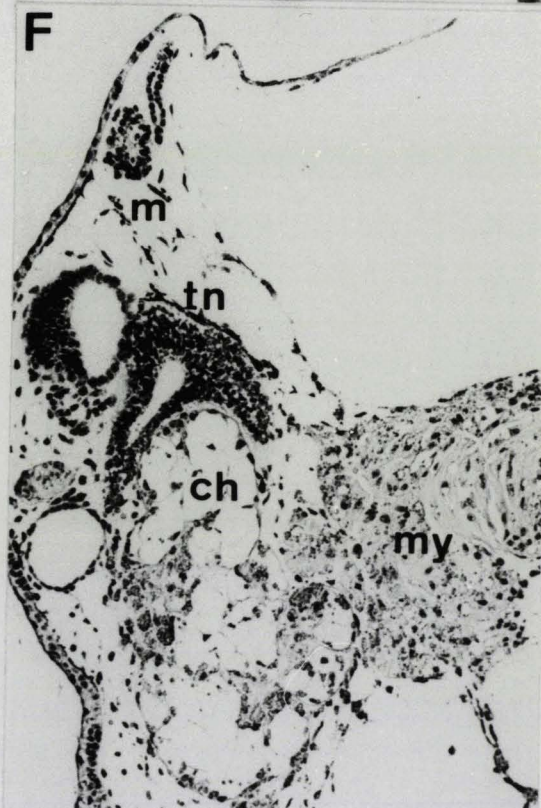
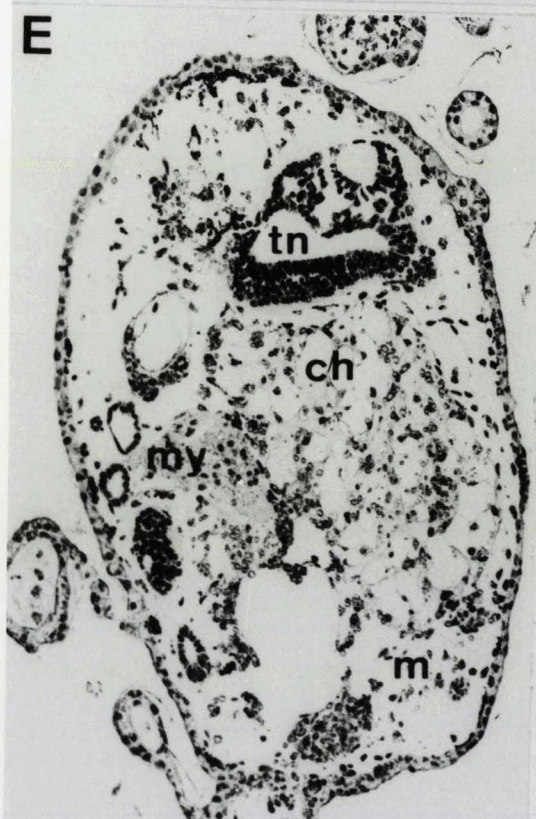
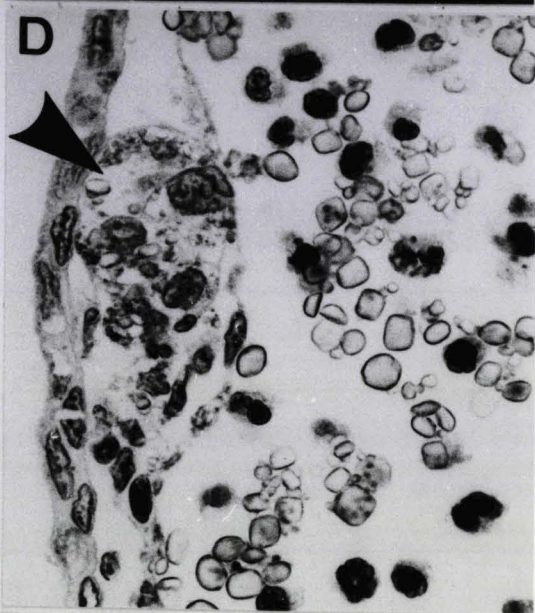
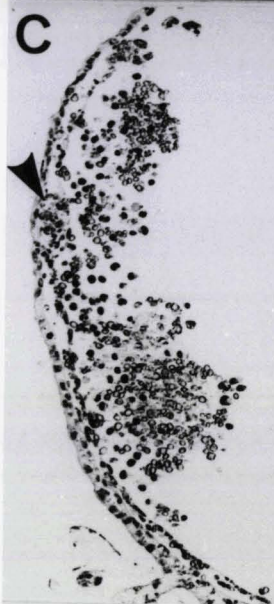
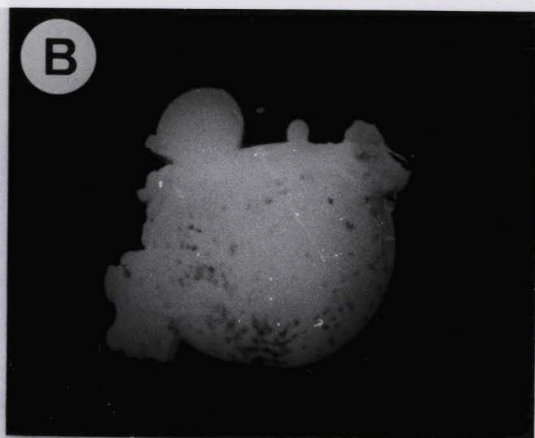
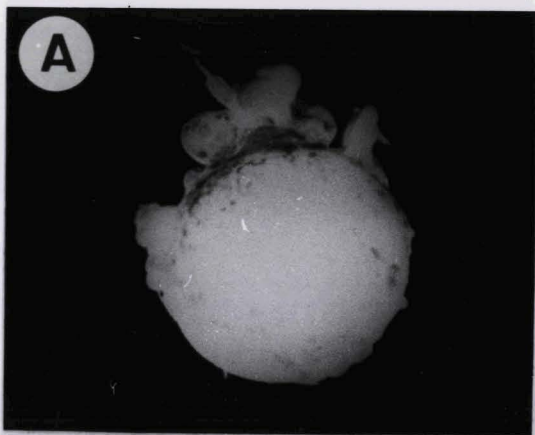


PLANCHE V

ETUDE HISTOLOGIQUE DES PRESTATIONS OBTENUES APRES RECOMBINAISON D'ECTODERME PRESOMPTIF (STADE 7) AVEC DE L'ENDODERME DORSAL OU VENTRAL PRELEVE AU STADE BLASTULA AGEE (STADE 7).

Recombinaison ectoderme et endoderme dorsal

Fig. A et B : Aspect général des prestations obtenues. Les vésicules renferment principalement des dérivés mésodermiques de type dorsal : une chorde (ch) flanquée de myotomes (my) occupe le niveau dorsal. On remarque la présence d'un tube neural (tn) et de nombreux tubules néphrétiques (tn). L'endoderme (en) participe fréquemment à la constitution de l'enveloppe vésiculaire. Cette organisation est comparable à celle que l'on observe chez un individu normal.
e, épiderme (A et B : x 81,25).

Recombinaison ectoderme et endoderme ventral

Fig. C, D, E et F : Lorsque l'endoderme ventral est associé à l'ectoderme présomptif les dérivés mésodermiques induits sont de type ventral. On reconnaît les structures mésodermiques ventrales typiques, mésenchyme (m) et mésothélium (me). Les c.g.p. se différencient au sein de ces structures, elles apparaissent groupées en îlots volumineux, soit dans une travée mésenchymateuse, soit contre un tubule néphrétique (tn). Les flèches indiquent l'emplacement des c.g.p.
e, épiderme (C et E : x 81,25 ; D et F : x 325).

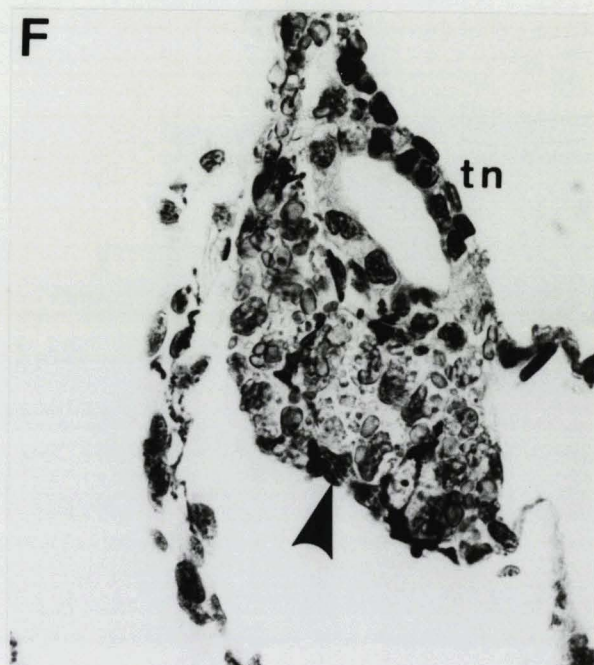
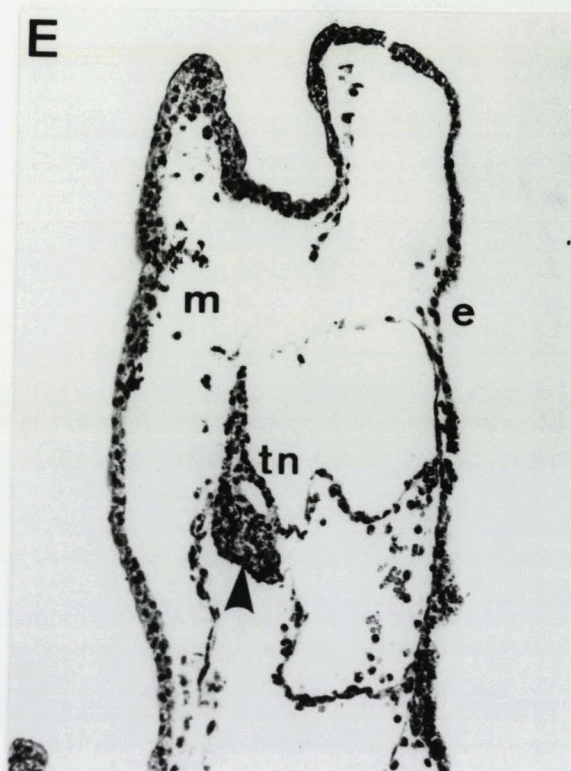
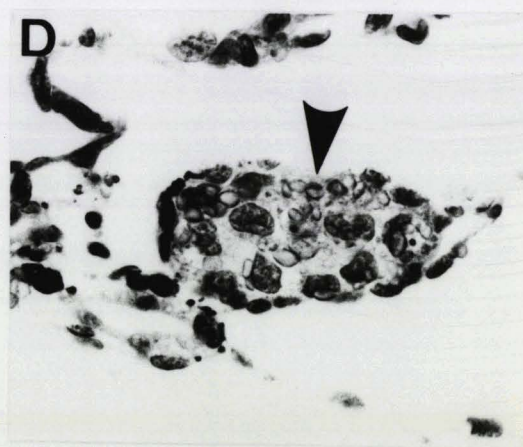
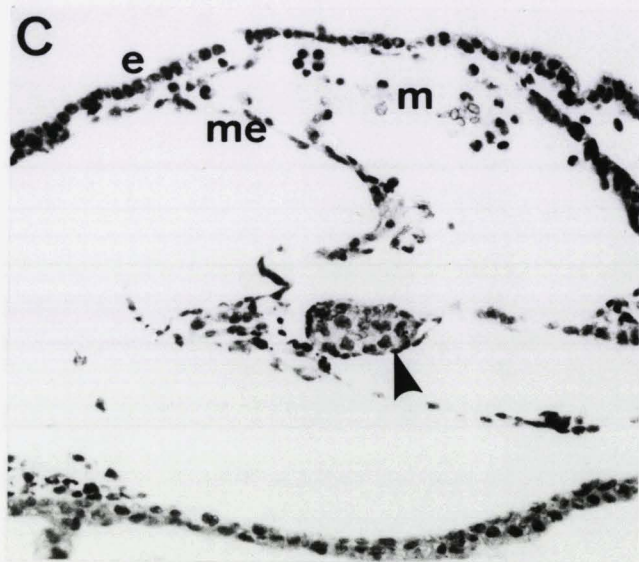
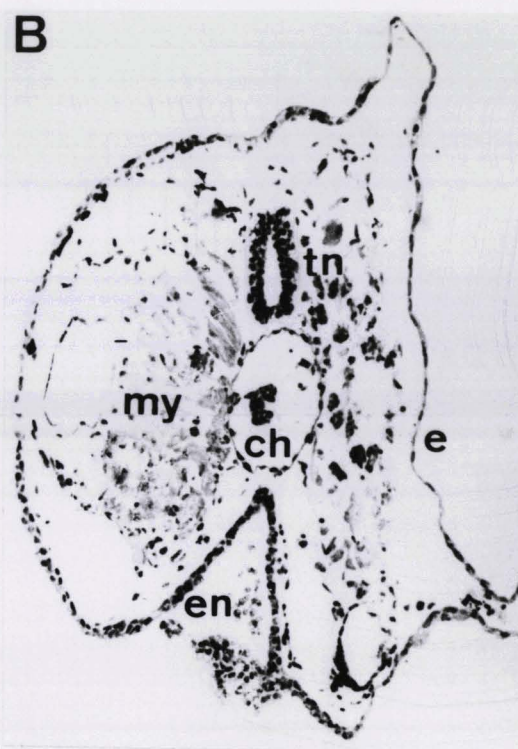
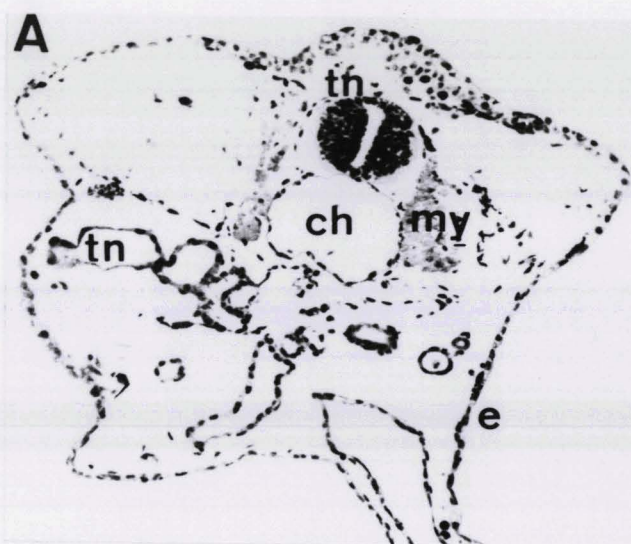


PLANCHE VI

ETUDE DES PRESTATIONS FOURNIES PAR LA RECOMBINAISON TEMPORAIRE OU DEFINITIVE DE DIFFERENTS FEUILLETS EMBRYONNAIRES.

Recombinaison temporaire entre l'ectoderme présomptif de stade 7 et l'endoderme ventral de stade 8a.

Fig. A, B, C et D : Contact limité à 16 h.

L'ectoderme fournit des dérivés mésodermiques ventraux, mésenchyme (m) et mésothélium (me). Dans quelques cas des c.g.p. se sont différenciées, ces cellules peu nombreuses s'observent au sein du mésenchyme (flèches) (A et C : x 130 ; B et D : x 325).

Recombinaison définitive entre l'ectoderme présomptif de stade 7 avec l'endoderme ventral et le chordo-mésoderme prélevés au stade 8a.

Fig. E : Aspect morphologique d'un prestation, on remarque l'organisation dorso-ventrale très apparente de la vésicule.
d, face dorsale ; v, face ventrale (E : x 12).

Fig. F : Aspect microscopique de la prestation. L'apport de chordo-mésoderme présomptif modifie le pattern de différenciation de l'explant, les c.p. g. n'apparaissent plus et les dérivés mésodermiques les plus abondants sont de type dorsal. On reconnaît la chorde (ch) et les myotomes (my) surmontés de structures neurales céphaliques. Du mésenchyme (m) et un mésothélium (me) sont observés au niveau ventral de la prestation.
co, capsule otique ; tn, tube neural (F : x 81,25).



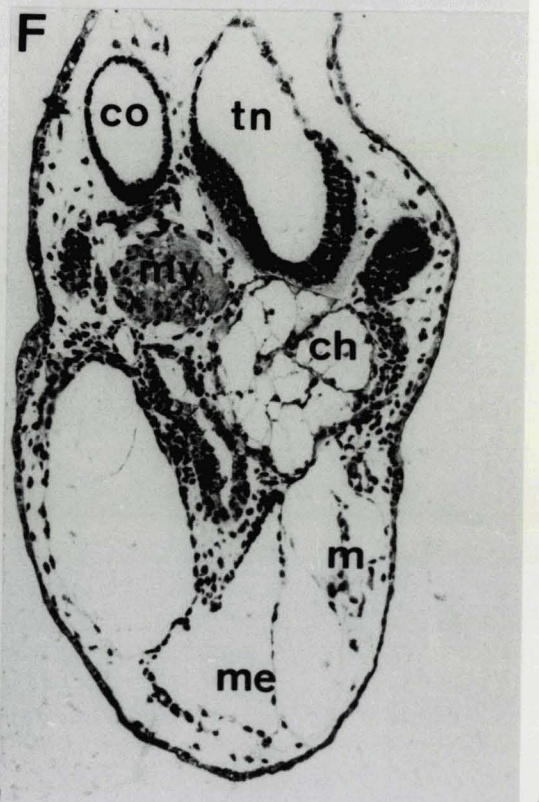
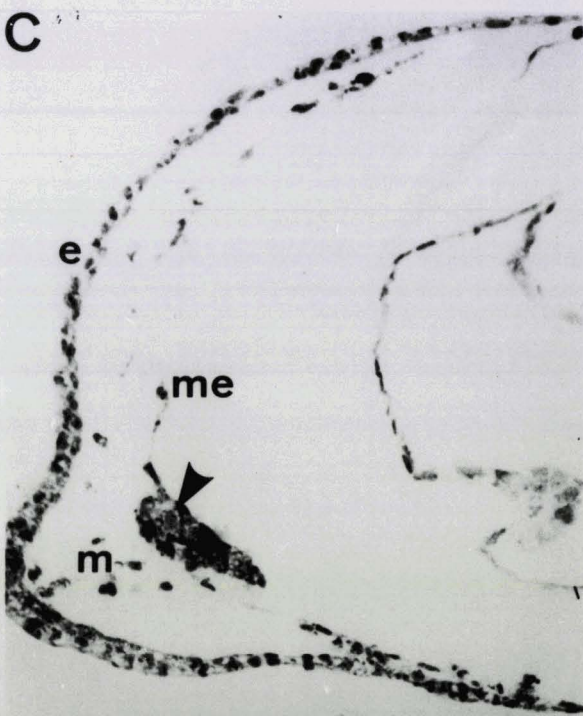
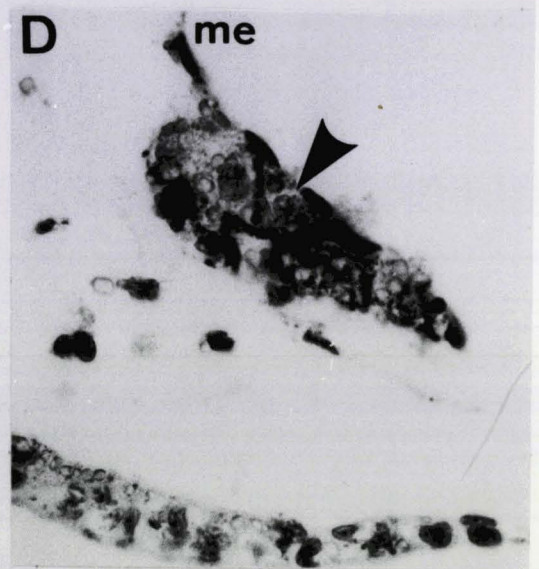
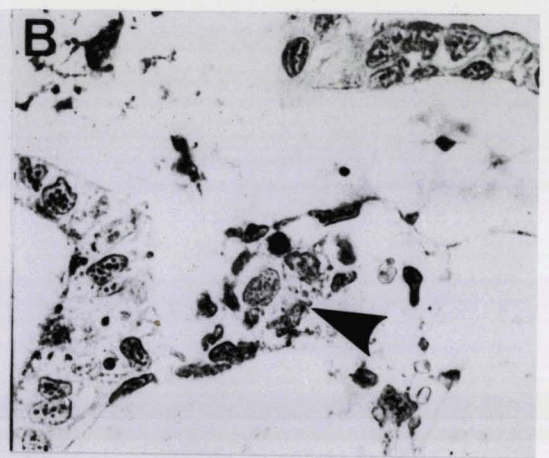
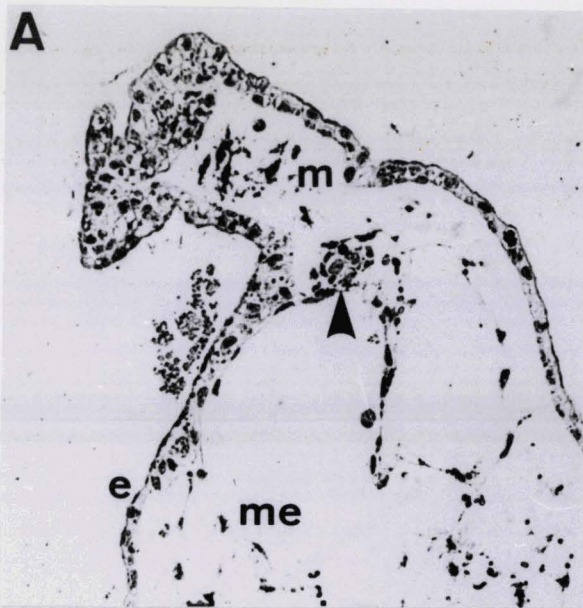


PLANCHE VII

ETUDE DES PRESTATIONS OBTENUES APRES CULTURE TRANSFILTRE D'ECTODERME PRESOMPTIF ET D'ENDODERME VENTRAL

- Fig. A : Illustration du dispositif mis en place pour étudier les interactions entre l'ectoderme (ec) et l'endoderme (en). Le filtre Nucléopore (nu) interposé entre les feuillets réactifs est percé en son centre. L'ectoderme envahit l'orifice et entre en contact avec l'endoderme, il se développe une vésicule qui déborde largement de la chambre de culture (A : x 10).
- Fig. B : Coupe méridienne dans la vésicule représentée dans la figure A. Le filtre Nucléopore utilisé (porosité $1\mu\text{m}$) est percé d'un orifice. Des dérivés mésodermiques ventraux, mésenchyme (m) et mésothélium (me) se sont différenciés au contact des 2 feuillets.
e, épiderme ; ec, ectoderme ; en, endoderme ; nu, Nucléopore (B : x 205).
- Fig. C, D, E et F : Autres prestations obtenues dans les mêmes conditions ; en plus des structures décrites précédemment des c. g. p. (flèches) sont observées au sein des dérivés mésodermiques induits (C et E : x 205 ; D et F : x520).

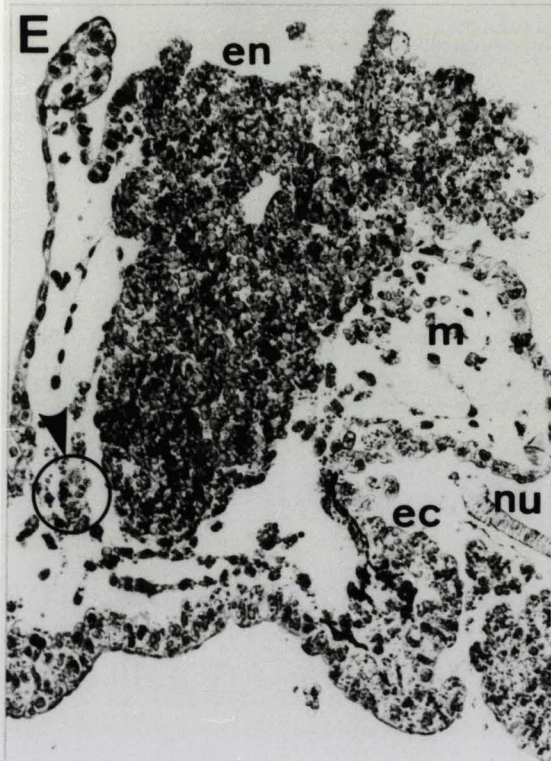
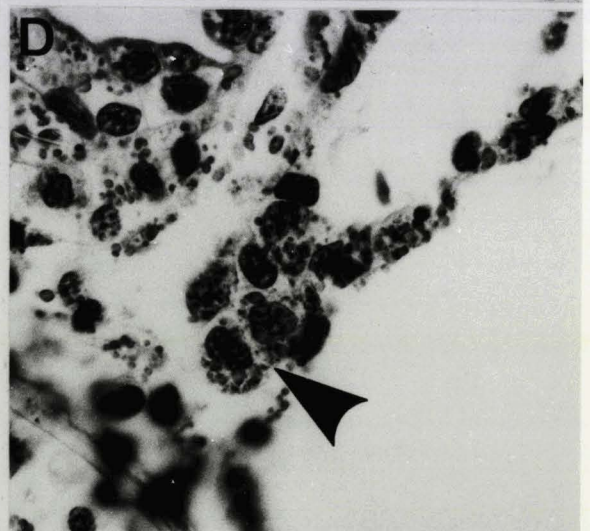
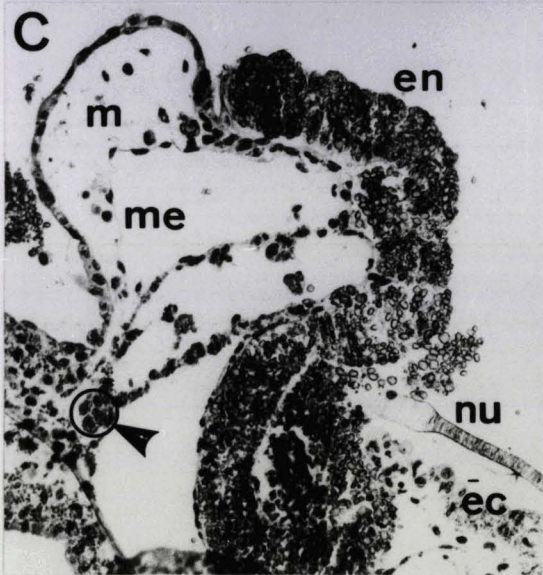
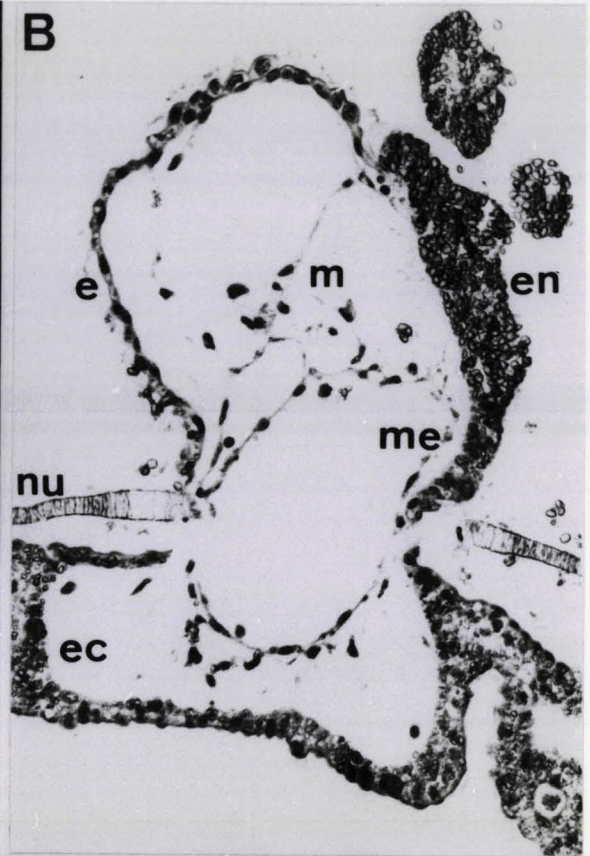
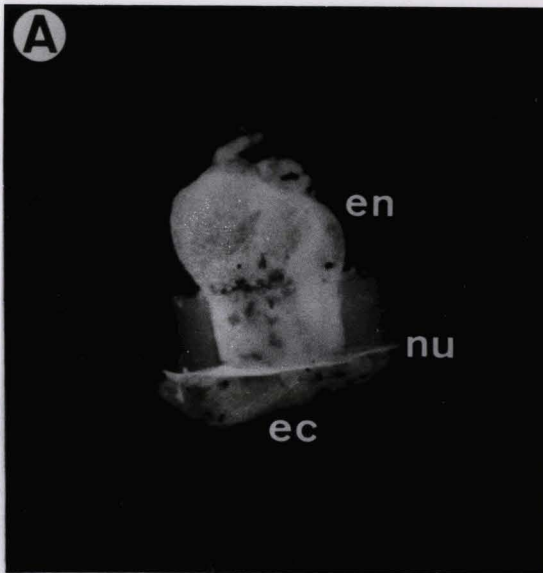


PLANCHE VIII

PRESTATIONS FOURNIES PAR LA CULTURE EN SANDWICH DE MESODERME LATERAL EN PRESENCE D'ENDODERME VENTRAL.

Fig. A et B : Aspect morphologique des prestations. Les fragments de mésoderme latéral prélevés au stade gastrula (st. 8a) et cultivés en sandwich en présence d'endoderme ventral (st. 8a) donnent naissance à des vésicules dépourvues apparemment de toute organisation (A et B : x 15).

Fig. C, D, E et F: Aspect microscopique des prestations. Les explants se différencient en vésicules épidermiques (e), tapissées intérieurement par du mésenchyme (m). Un mésothélium (me) limite une vaste cavité centrale. L'endoderme (en) reste indifférencié. Nous avons mis en évidence des c. p. g. (flèches), ces cellules groupées en îlots apparaissent au sein du mésenchyme (C et E : x 81,25 ; D et F : x 325).

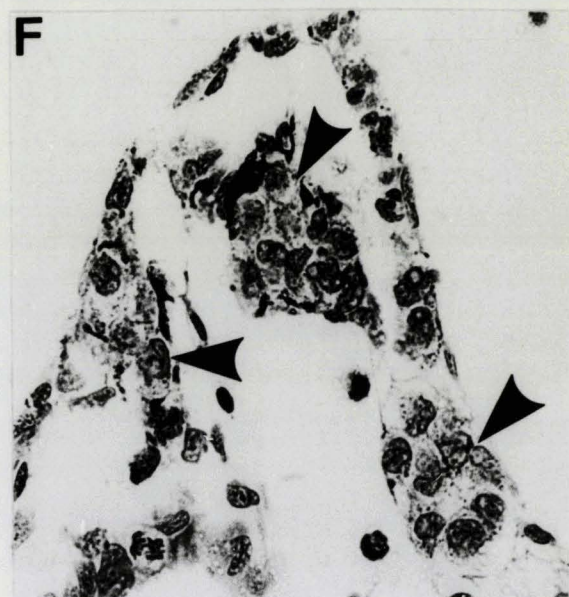
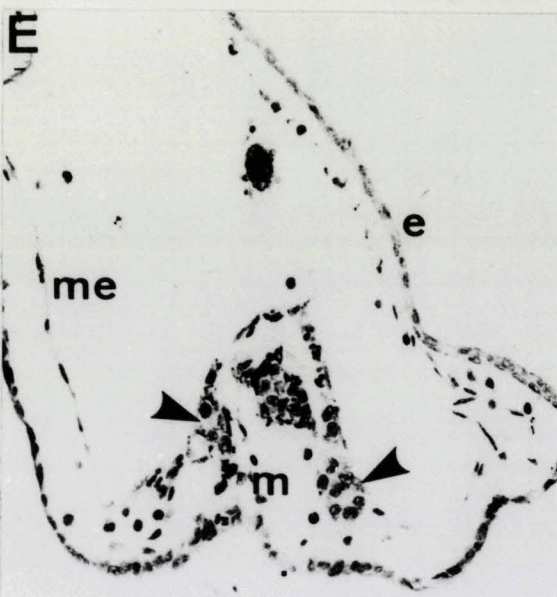
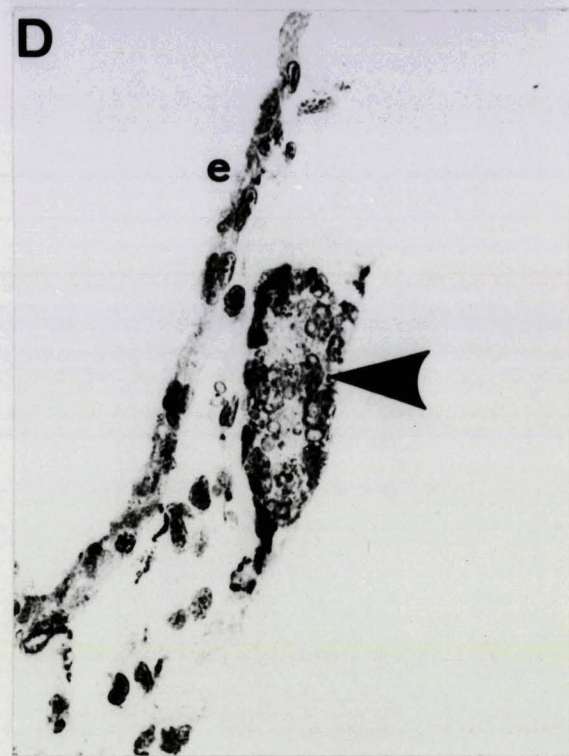
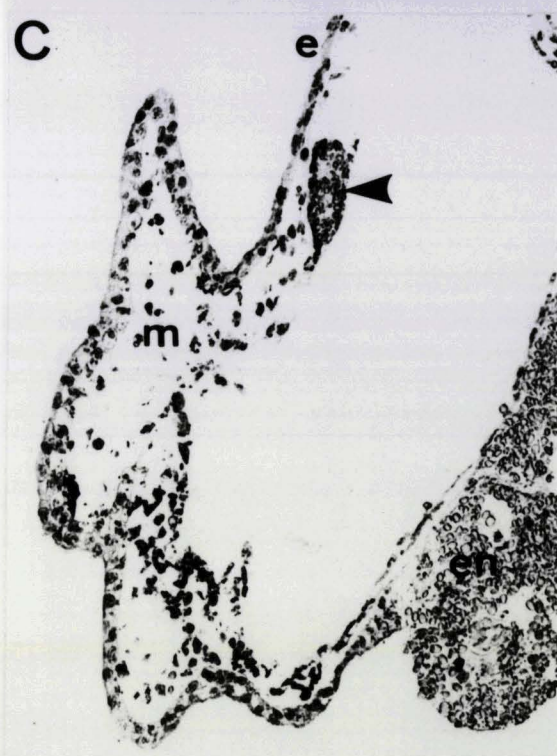
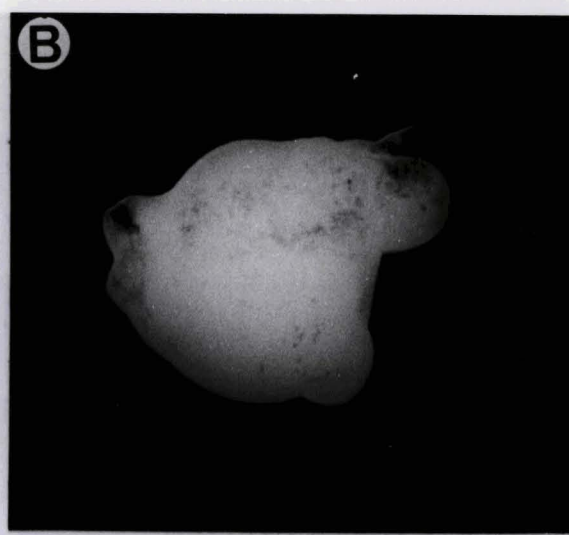
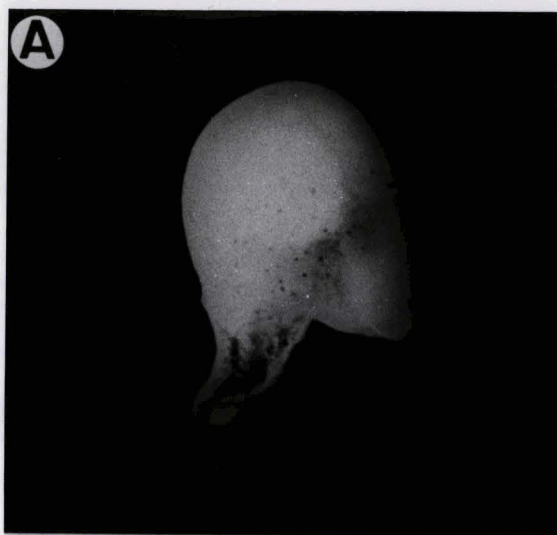


PLANCHE IX

ETUDE HISTOLOGIQUE DES REACTIONS OBTENUES A L'ETAT LARVAIRE
APRES TRANSPLANTATION EN POSITION DORSALE OU VENTRALE DE
FRAGMENTS DE MESODERME LATERAL PRELEVES AUX STADES DE LA
GASTRULATION.

**Réactions obtenues après transplantation dorsale de mésoderme latéral
présomptif de gastrula âgée (st. 13).**

Fig. A et B : Le greffon s'est différencié en hématies (h) et en c. g. p. (flèches).
ch, chorde ; my, myotomes ; tn, tube neural (A : x 205 ; b : x 225).

**Réactions obtenues après transplantation ventrale de mésoderme latéral
présomptif de jeune gastrula (st. 8a).**

Fig. C et D : Des c. g. p. (flèches) se sont différenciées au sein du mésenchyme
entre la somatopleure et l'épiderme de l'hôte.
c, cavité coelomique ; td, tube digestif (C et D : x 205).



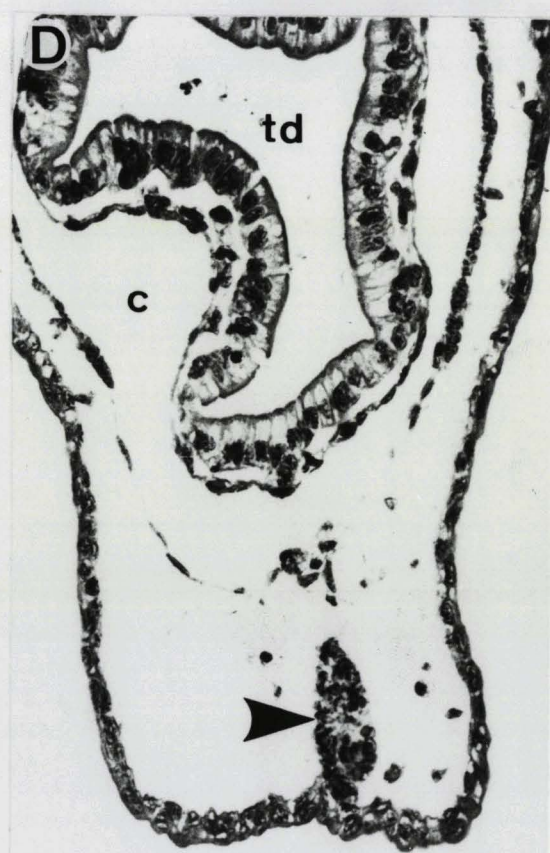
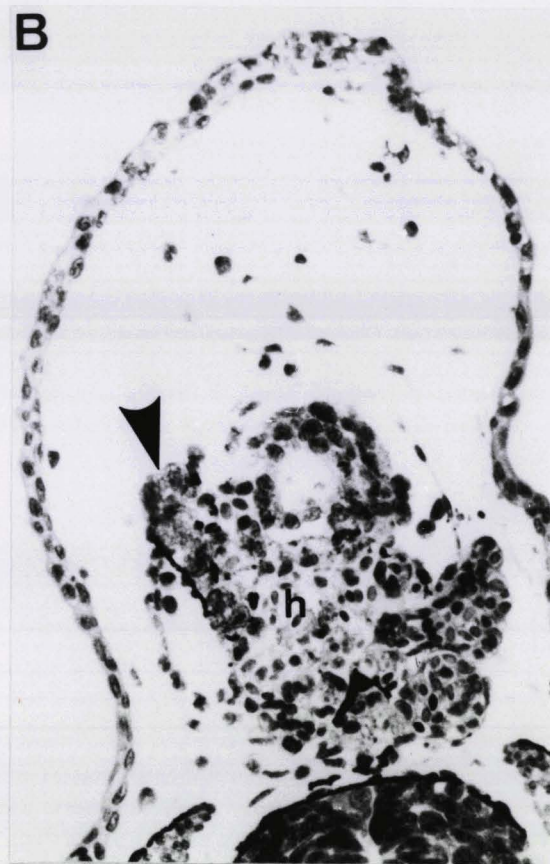
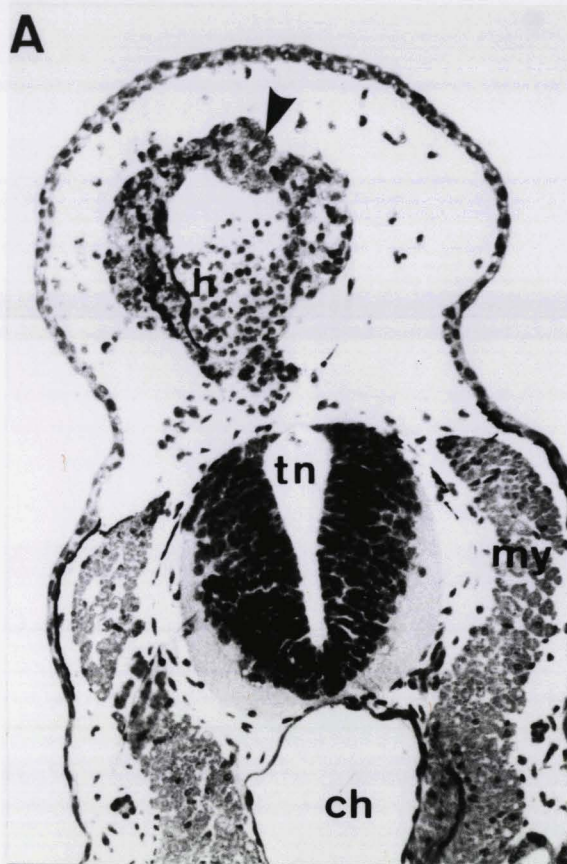


PLANCHE X

PRESTATIONS FOURNIES PAR LA MISE EN CULTURE DE BLASTOMERES ISOLES AU STADE 8 CELLULES.

Culture des 4 blastomères animaux.

- Fig. A : Aspect morphologique. Les blastomères animaux évoluent en une vésicule creuse, plurilobée, plus ou moins pigmentée (A : x 12).
- Fig. B : Aspect microscopique. La vésicule décrite dans la figure A est limitée par un épiderme (e), les structures mésodermiques sont absentes. (B : x 81,25).

Culture des 4 blastomères végétatifs.

- Fig. C : Aspect morphologique. Les blastomères donnent naissance à une vésicule ovoïde, apparemment riche en dérivés mésodermiques (C : x 12).
- Fig. D : Aspect microscopique. La vésicule obtenue présente une certaine organisation. On reconnaît les structures dorsales habituelles : une chorde (ch) surmontée d'un tube neural (tn) et flanquée de myotomes (my). Les tubules néphrétiques (tn) sont abondants. Le reste de la prestation est occupé par du mésenchyme (m) et une cavité coelomique (c) (D : x 81,25).

Culture des 2 blastomères végétatifs dorsaux associés aux 2 blastomères animaux dorsaux.

- Fig. E : Aspect morphologique. La prestation obtenue présente une forte ressemblance avec une larve normale non opérée. On distingue aisément la région céphalique pourvue d'yeux bien développés et prolongée par un corps harmonieusement constitué. Seule la région ventrale paraît incomplète (E : x 12).
- Fig. F : Aspect microscopique. L'examen histologique confirme nos précédentes observations. Les structures dorsales sont presque normales. Chorde (ch), myotomes (my) et un tube neural (tn) caractérisent le niveau dorsal. L'endoderme (en) reste peu différencié et ne forme jamais de tube digestif typique. c, cavité coelomique ; m, mésenchyme (F : x 81,25).



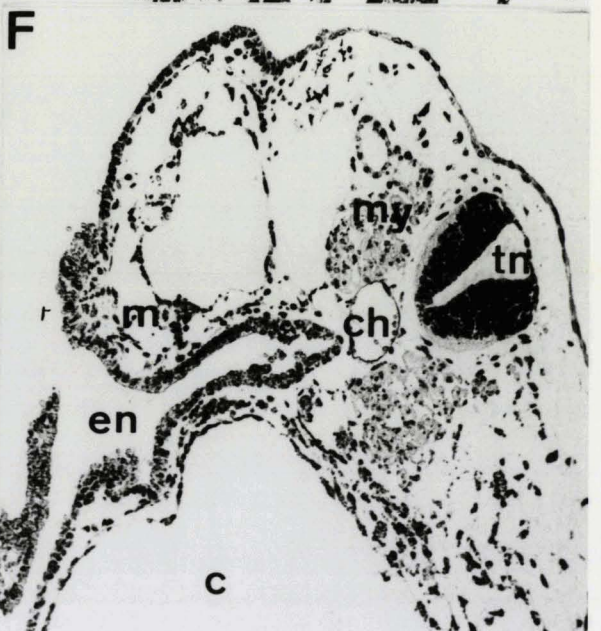
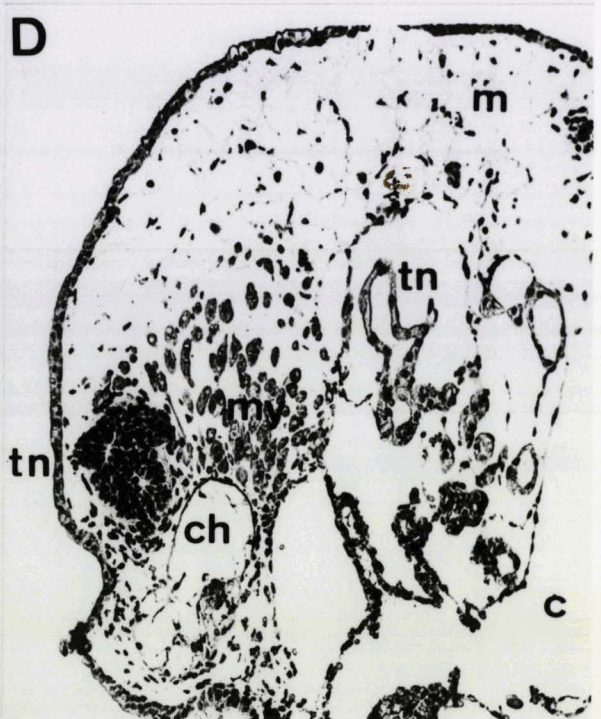
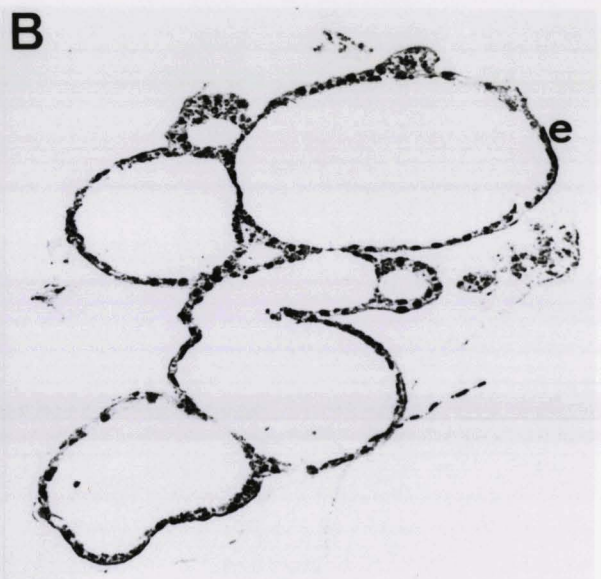
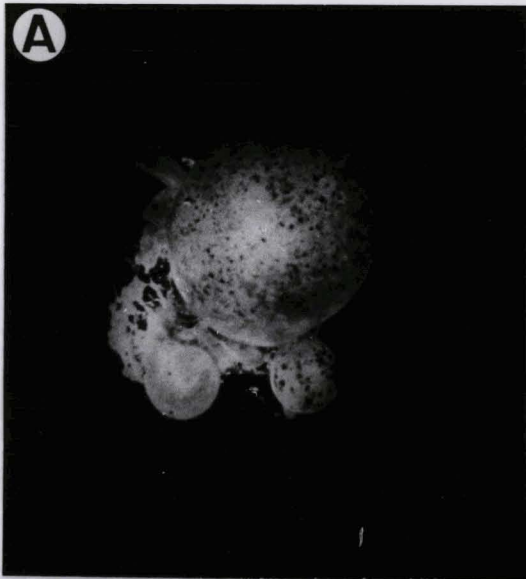


PLANCHE XI

PRESTATIONS FOURNIES PAR LA MISE EN CULTURE DE BLASTOMERES ISOLES AU STADE 8 CELLULES (SUITE).

Culture des 2 blastomères végétatifs ventraux associés aux 2 blastomères animaux ventraux.

Fig. A et B : La culture de la moitié ventrale de l'embryon donne naissance à une vésicule épidermique (e) remplie par des dérivés mésodermiques ventraux, mésenchyme (m) et mésothélium (me). On observe des c. g. p. (flèches) groupées en un îlot au sein du mésenchyme. (A : x 81,25 ; B : x 315).

Culture des 2 blastomères végétatifs ventraux.

Fig. C et D : Les blastomères isolés évoluent en une vésicule épidermique (e) du même type que celui décrit dans la figure A. Les structures mésodermiques sont cependant moins abondantes. Une vaste cavité coelomique (c) occupe la presque totalité de la vésicule, le mésenchyme (m) est restreint. Des c. g. p. (flèches) se sont différenciées, formant un îlot important dans le mésenchyme (C : x 81,25 ; D : x 315).



