

Un nouveau type de chromosomes sexuels chez un mammifère

(*Ellobius lutescens* THOMAS – Rodentia – Microtinae)

La sous-famille des *Microtinae*, dont 18 espèces sont cytologiquement caractérisées, offre un tableau cytologique cohérent: les nombres diploïdes varient de 30 à 62 et les nombres fondamentaux sont compris entre 50 et 64. Chez toutes les espèces, le ♂ possède un couple *X-Y* se disjoignant préréductionnellement. L'*X* est toujours grand, acrocentrique ou métacentrique; l'*Y* varie beaucoup: en forme de *V* à bras inégaux, ayant à peu près la taille de l'*X* dans certains cas (*Microtus oeconomus*, *Arvicola shermani*), il est très grand et acrocentrique chez *Microtus agrestis*, mais beaucoup plus souvent réduit à des dimensions très faibles, de 1 à 2 μ .

Or, le Dr BALTHAZAR (Institut Pasteur de Téhéran) auquel j'exprime ici ma reconnaissance, m'a envoyé plusieurs exemplaires d'un *Microtinae* fouisseur, remarquable par ses caractères adaptatifs très prononcés, yeux minuscules, oreille externe et queue rudimentaires, incisives proéminentes, *Ellobius lutescens* THOMAS. La saison étant un peu avancée lorsque j'ai reçu cet intéressant matériel, la spermatogénèse touchait à sa fin et les observations qui suivent devront être complétées. Dès maintenant elles révèlent des faits extraordinaires.

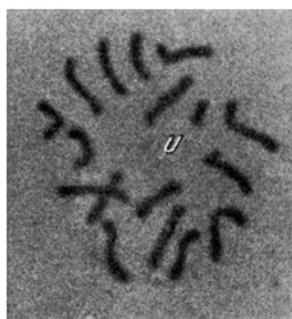


Fig. 1.

Métaphase spermatogoniale.

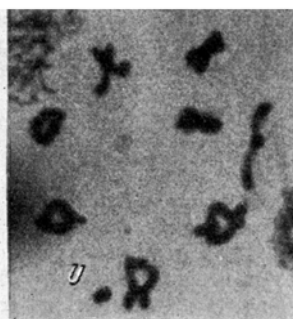


Fig. 2.

Métaphase auxocytaire.

La lettre *U* désigne l'élément impair univalent. FEULGEN. $\times 1500$.

J'ai examiné les testicules de 4 ♂♂ adultes. Le nombre $2N$ est égal à 17 (Fig. 1) et l'assortiment chromosomique comprend: 1 paire de grands *V* à bras inégaux (1/2); 1 paire de grands à bras très inégaux (1/4); 1 paire de *V*, plutôt petits à bras égaux; 5 paires d'autosomes acrocentriques (1/5 à 1/6); enfin, un très petit *V* symétrique et impair. Si nous négligeons les bras courts des éléments acrocentriques, le *N.F.* peut être évalué à 20. La métaphase I (Fig. 2) montre 8 tétrades et un univalent dont la ségrégation est probablement préréductionnelle. Il s'ensuit que les spermatozoïdes compteront 8 ou 9 chromosomes. Il est dès lors tentant de considérer le petit *V* impair comme un *X*: notre *Ellobius* aurait la formule ♂: $2N = 16 + X$; ♀: $2N = 16 + 2X$.

Avant d'aller plus loin, formulons les deux remarques suivantes: les nombres 17 et 20 sont les plus bas que nous connaissions chez un Euthérien; il n'y a aucun exemple certain de digamétie *X-O* chez un mammifère, à l'exception peut-être de *Microtus montebelli* qui devrait être réétudié¹. J'ai examiné les ovaires et la moëlle osseuse de deux femelles: les mitoses de la lignée myélo-

blastique montrent de nouveau 17 chromosomes, dont le petit élément impair, nettement reconnaissable. Une seule cinèse (sur 25) montre 2 petits *V*, mais le nombre total est encore de 17. Enfin, une division n'avait que 16 chromosomes, le *V* impair étant présent. Une métaphase I, trouvée dans un ovocyte mûr, présente 8 tétrades et le petit chromosome de caractère apparemment univalent.

A moins que la moëlle osseuse ne dérive d'une lignée cellulaire ayant éliminé un chromosome *X*, ce qui est bien invraisemblable, ces faits sont extraordinaires et semblent indiquer un mécanisme de détermination sexuelle original et aberrant. Avant de formuler des hypothèses, l'analyse cytologique devra être poussée aussi loin que possible.

R. MATTHEY

Laboratoire de zoologie de l'Université de Lausanne, le 17 septembre 1953.

Summary

Ellobius lutescens, a vole, has a diploid number of 17 in both sexes. This was determined in the testes (♂) and in the bone-marrow (♀). The number is the lowest ever seen in an eutherian mammal and falls wide of the formulae of the other *Microtinae*.

Unless the myeloblastic cell line eliminates one *X*-chromosome in the female, which seems very unlikely, we have to deal with an entirely new type of sex-determination.

Telophase Behavior of Extranuclear Chromatin and Its Bearing on Telophase Changes in Chromosomes¹

Acentric chromosome fragments differ from centric fragments in both time of onset and extent of telophase change in neuroblasts of grasshopper embryos² and in pollen of *Tradescantia paludosa*³. Herein reported are further observations on the aberrant telophase behavior of acentric fragments in neuroblasts as well as observations on the telophase behavior of portions of unbroken chromosomes which, under certain conditions, protrude from the nuclear region. These observations will be discussed with respect to their bearing on the problem of telophase changes in chromosomes.

A brief review of the normal course of telophase changes in chromosomes, as recognized in aceto-carmin stained preparations of neuroblasts of *Chortophaga viridifasciata* (DE GEER) embryos, will facilitate description of the abnormal telophase behavior of extranuclear chromatin. The beginning of telophase change (Fig. 1, upper group of chromosomes) is manifest in the disappearance of both the sharp outline and the uniform intense staining which characterize the chromosomes at anaphase. As the cell progresses through early telophase the chromatin becomes more diffuse. The centromere regions, however, remain condensed (all centromeres are terminal). Although the nuclear membrane has not yet appeared, the region of the cell occupied by the chromosomes and the polar spindle material—the nuclear region—is distinct from the cytosome at early telophase. By middle telophase each chromosome consists of a

¹ Work performed for Atomic Energy Commission under Contract No. W-7405-eng-26.

² J. G. CARLSON, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 24, 500 (1938).

³ The author is grateful to Dr. C. P. SWANSON for this observation

¹ K. OGUMA, Cytologica 5, 796 (1937).

fuzzy central core surrounded by diffuse chromatin which mingles with that of adjacent chromosomes. The centromere regions are distinct but slightly irregular in outline. The nuclear membrane forms at the polar boundary of the nuclear region. By late telophase the chromatin, even that in the centromere region, is quite diffuse; the formation of the nuclear membrane is complete at the apolar boundary of the nuclear region.

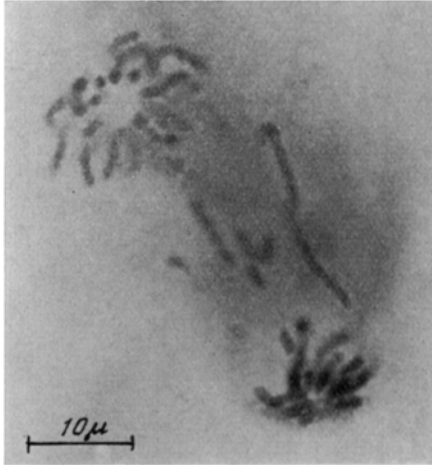


Fig. 1.—Photograph of a grasshopper neuroblast and its small daughter ganglion cell at early telophase. In the neuroblast (upper cell) it will be noted that the chromosomes have lost the sharp outline and uniform intense staining which characterized them at anaphase. The chromosome fragments in the cytoplasm still have the appearance of anaphase chromosomes. (The cell was given 64 r of X-rays at the preceding interphase or very early prophase.)

A large number of telophase cells in grasshopper embryos given 64 r of X-rays and stained with acetocarmine have been studied to determine the appearance of the chromosome fragments. All telophase neuroblasts which contain fragments have been found to exhibit an asynchrony in telophase change in the centric and acentric fragments. In early telophase cells, the X-ray-induced acentric fragments lying apart from the chromosome group are in an anaphase condition, whereas the centric fragments and the unbroken chromosomes are in an early telophase condition (Fig. 1). Middle telophase cells contain fragments in the anaphase to early telophase state. In late telophase cells acentric fragments have the appearance of early to middle telophase chromatin. No cells have been seen in which the chromatin of the acentric fragments is in late telophase or interphase state. These observations clearly show that the initiation and progression of telophase change are not the same for acentric fragments as for centric fragments and unbroken chromosomes.

Several telophase cells have been observed in which portions of the chromosomes protrude from the nuclear region. Chromosomes of neuroblasts X-irradiated in late prophase tend to be slightly sticky at the subsequent anaphase (all other aspects of the cell are normal). Although this slight stickiness rarely results in breakage of the chromosomes¹, it sometimes causes several of the sister chromosomes to be pulled out so that their distal ends project beyond those of the other chromosomes. Figure 2 is a photograph of an early-middle telophase

neuroblast, which had sticky chromosomes at anaphase, and its small daughter ganglion cell. The condensed appearance of the chromatin in the ganglion cell at telophase is characteristic of the differentiation which occurs in the formation of this cell. Possible factors contributing to the condensed state of the ganglion cell chromatin and its significance will be discussed in another report. In this report only the chromatin in the neuroblast will be considered.

Figure 2 shows that the projecting distal portion of each of the three pulled-out chromosomes in the neuroblast is only beginning to undergo telophase change whereas the proximal portion is in the early to middle telophase condition. Transition from the intensely staining, condensed type of chromatin in the distal portion to the less intensely staining, diffuse type in the proximal portion occurs at the edge of the nuclear region. The diffuseness of the chromatin within the nuclear region is associated with a swelling of the chromosomes—the proximal portion of each pulled-out chromosome begins to spread out inside the boundary of the nuclear region. At the centre of the nuclear region the swelling is of such degree that adjacent chromosomes merge, making the individuality of the chromosomes less distinct. The centromere regions have changed very little from the anaphase condition.

Thus we see that those portions of chromosomes, both centric and acentric, which lie outside the nuclear region do not undergo telophase change at the same time or to the same extent as do those portions within the nuclear region. This suggests that the factor or factors mainly responsible for changes in chromosomes at telophase are located within the nuclear region of the cell. The evidence obtained from neuroblasts with protruding chromosomes further indicates that the chromosomes swell considerably during telophase.

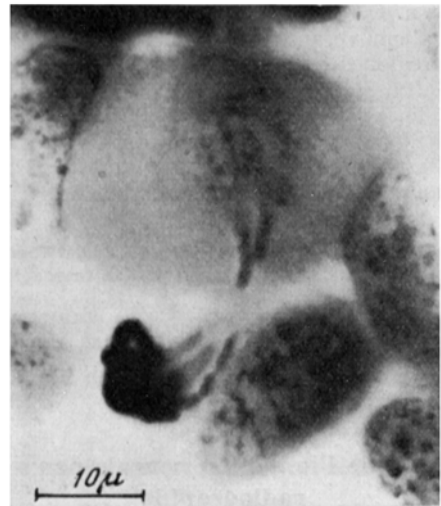


Fig. 2.—Photograph of grasshopper neuroblast and its small daughter ganglion cell in early-middle telophase. Note in the neuroblast cell (upper cell) the difference in extent of telophase change between the proximal and distal portions of the pulled-out chromosomes. (The cell received 64 r of X-rays at the preceding late prophase.)

¹ Only about 0.01% of the chromosomes are broken when neuroblasts receive 64 r of X-rays at late prophase.

It is tempting to speculate that the intranuclear substance responsible, at least in part, for the swelling of chromosomes at telophase is the spindle material. Observations on living neuroblasts have revealed that the spindle in these cells arises from the karyolymph of

the late prophase nucleus¹. It may well be that during telophase spindle material becomes intimately associated with the chromatin, and that during prophase it is gradually released, as the chromosomes shorten, to give rise to "karolymp", which in turn gives rise to a spindle after nuclear membrane breakdown. That spindle material is in some way connected with telophase change can be further inferred from observations on cells in which the spindle has been altered experimentally. HUGHES² and GAULDEN³ found that the behavior of the spindle material determines the time of onset of telophase change in cells recovering from complete destruction of a functional spindle by hypotony and by heat. If the spindle re-forms, onset of telophase change is delayed until the chromosomes have reached the poles of the spindle at anaphase. If, however, the spindle does not re-form, the chromosomes show telophase change immediately. It appears that telophase change occurs when the chromosomes are closely associated with disorganized spindle material, a situation which normally obtains at the beginning of telophase.

The role of the chromosome itself in the initiation and progression of telophase change remains obscure. The evidence herein presented shows, however, that the chromosomes are not solely responsible for the changes which are manifest in them at telophase, but that they are dependent to some extent on other factors.

MARY ESTHER GAULDEN

Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn., U.S.A., June 21, 1953.

Zusammenfassung

Extranukleares Chromatin, in der Form azentrischer Fragmente oder Teile ungebrochener Chromosomen, welche aus der Kernregion von Heuschrecken-Neuroblasten herausragen, unterliegt nicht gleichzeitig mit dem intranuklearen Chromatin den telophasischen Veränderungen. Der oder die für die Telophaseveränderungen vor allem verantwortlichen Faktoren scheinen in der Kernregion der Zelle lokalisiert zu sein. Es werden Belege dafür gegeben, dass die Chromosomen während der Telophase sich bedeutend vergrössern, und es wird die Ansicht vertreten, dass im Spindelmaterial, zum Teil wenigstens, die für die Schwellung der Chromosomen verantwortliche Substanz zu sehen ist.

¹ J. G. CARLSON and A. HOLLAENDER, J. Cellular Comp. Physiol. 31, 149 (1948). – M. E. GAULDEN and J. G. CARLSON, Exptl. Cell Res. 2, 416 (1951).

² A. HUGHES, Quart. J. Microscop. Sci. 93, 207 (1952).

³ M. E. GAULDEN, J. Tenn. Acad. Sci. 23, 162 (1948).

Analyse de l'induction neurale par autoradiographie

Les expériences de BRACHET¹ ont montré clairement, quoique de manière indirecte, que l'induction neurale s'accompagne d'une migration de granules, colorables au rouge neutre, qui passent du chordoblaste dans le neuroblaste.

Il nous a semblé utile d'étendre ces expériences en utilisant la méthode autoradiographique pour la mise en évidence d'une éventuelle diffusion des macromolécules marquées de l'organisateur vers l'ectoderme.

¹ J. BRACHET, Exper. 6, 56 (1950).

Nous avons, dans ce but, utilisé la technique des émulsions nucléaires qui permet une localisation précise et une estimation quantitative de l'isotope tant dans le greffon que dans l'hôte.

Plusieurs séries d'expériences ont porté sur des embryons de Batraciens de différentes espèces (Pleurodèles, Axolotl, *Rana fusca*, *Rana temporaria*); elles ont consisté, soit en greffes d'organiseurs marqués dans des embryons entiers, soit en explantations: dans ce cas le neuroblaste marqué a été accolé à de l'épiblaste non marqué et vice versa.

Un essai préliminaire a montré que le glyocolle pénètre mal dans les embryons entiers conformément aux résultats déjà obtenus par FRIEDBERG et EAKIN¹ et par BRACHET et BRYGIER² au moyen d'autres méthodes. Nous avons donc placé des organisateurs isolés dans le milieu radioactif.

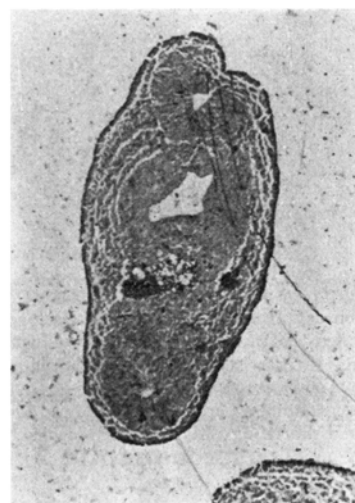


Fig. 1. Induction obtenue par la greffe d'un organisateur de *Rana fusca* dans un embryon d'Axolotl. – La préparation histologique est recouverte d'émulsion photographique puis colorée au vert de Méthyle-Pyronine.

Les images les plus convaincantes ont été obtenues dans les cas où l'hôte et le greffon provenaient d'espèces différentes et où ils étaient donc aisément reconnaissables. En voici un exemple: les organisateurs de jeunes gastrulas de *Rana fusca* ont été prélevés stérilement et soumis à un séjour de 3 h dans de la solution de HOLTFRETER stérile additionnée de 0,5 $\mu\text{M}/\text{cm}^3$ de glycine- I_{-14}C .

Après lavages soigneux et répétés dans du HOLTFRETER contenant du glyocolle non marqué, les greffons de *Rana fusca* ont été implantés dans des blastulas avancées d'Axolotl. Les embryons ont été fixés après 2 et 3 jours de développement, puis enrobés et coupés à 10 μ d'épaisseur.

Les coupes ont été alors recouvertes d'émulsion photographique G₅ ILFORD «in gel form», suivant la technique exposée antérieurement³. Après 3 à 5 jours d'exposition en chambre noire, les préparations ont été développées, fixées et colorées à travers la gélatine par la méthode d'UNNA (Fig. 1).

Dans les cas positifs (50%), on observe une radioactivité intense dans le greffon (Fig. 2). Une activité significative se manifeste aussi dans le système nerveux

¹ F. FRIEDBERG et R. M. EAKIN, J. exp. Zool. 110, 33 (1949).

² J. BRACHET et J. BRYGIER (communication personnelle).

³ A. FICQ, F. GAVOSTO et M. ERRERA, Exper. Cell. Res. (sous presse).