

Action du LiCl sur de jeunes blastodermes de poulet cultivés *in vitro*¹

L'action spécifique du LiCl sur la morphogenèse est une découverte déjà ancienne. Les malformations qu'il provoque sont connues pour bon nombre d'espèces d'Invertébrés et de Vertébrés anamniotes. En revanche, les quelques travaux publiés à ce sujet sur les Amniotes, à savoir sur les oiseaux, n'ont rien fourni de décisif. LANDAUER² ne constate qu'une augmentation du taux de mortalité parmi ses embryons traités. NAZ et RULON³ injectent du LiCl isotonique dans l'œuf avant son incubation ou après 48 h de développement sans rencontrer de malformations électroniques.

La culture *in vitro* m'offre la possibilité de préciser le mode d'action de cet agent sur les oiseaux et d'entreprendre une étude systématique de ses effets. La présente note décrit la technique employée et les premiers résultats de l'étude en cours.

Technique. La culture *in vitro* est celle de NEW⁴, mais légèrement modifiée pour permettre le transport des blastodermes sur différents milieux. Le jaune d'œuf de White-Leghorn est immergé dans une solution de Tyrode isotonique au plasma de poule (HOWARD⁵). Le blastoderme est détaché du vitellus avec une rondelle de membrane vitelline que l'on étale, la face ventrale du blastoderme orientée vers le haut, sur un anneau de verre disposé au fond d'un verre de montre contenant le milieu utilisé. Pour maintenir la tension de la membrane vitelline et faciliter le transport du blastoderme, on emboîte un anneau, d'un diamètre interne légèrement plus grand, sur le premier (GALLERA et NICOLET⁶). Des blastodermes prélevés à des stades précis, depuis la ligne primitive courte jusqu'à l'apparition des premiers somites, sont soumis à l'action de LiCl pendant un laps de temps déterminé (8 h au maximum), puis ils sont transportés sur de l'albumen pur. Ils sont ensuite fixés après 36 à 48 h d'incubation totale.

Le milieu lithiné est composé d'une part d'albumen mélangé à un volume équivalent de Tyrode dans lequel le NaCl a été substitué par le LiCl.

Afin de vérifier si le Tyrode nuit au développement des blastodermes, des témoins sont cultivés pendant un temps comparable sur un milieu à base de Tyrode et d'albumen. La solution saline ne semble pas avoir des effets nocifs, par contre le développement de ces embryons est retardé s'ils sont mis en culture avant la formation du prolongement céphalique. Ces conditions de culture défavorisent donc l'anabolisme protéinique embryonnaire (NEW⁷; BRITT et HERMANN⁸).

Résultats expérimentaux. Le chlorure de lithium agit en premier lieu sur les mouvements morphogénétiques aboutissant à la mise en place des ébauches embryonnaires, secondairement sur leur organisation ultérieure. Les blastodermes sont sensibles au LiCl à tous les stades à partir desquels ils ont été soumis à son action. Les variations individuelles sont importantes, toutefois sans masquer le fait que la sensibilité au lithium diminue brusquement au moment où l'invagination du mésoblaste embryonnaire s'achève et par la suite au début de la neurulation.

Si les blastodermes sont prélevés avant l'apparition du prolongement céphalique et soumis à une action prolongée de lithium, le corps embryonnaire ne se forme pas. L'extension de l'aire vasculaire est entièrement bloquée et l'aire pellucide ne subit qu'une légère élongation. Cependant, du mésoblaste extra-embryonnaire s'est invaginé en formant un croissant postérieur d'ilôts sanguins compacts en différenciation.

A partir du stade du prolongement céphalique le lithium ne peut agir que sur l'organisation du corps embryonnaire et la différenciation de ses ébauches. Le cerveau, l'intestin céphalique, le cœur et le tronc manifestent d'évidentes hypomorphoses. Ces embryons ont de nettes tendances à l'omphalocéphalie. Très schématiquement on distingue trois degrés en ordre de gravité décroissante: (1) Le cerveau extrêmement réduit, en particulier l'acréncéphale, constitue un tubule à paroi mince. Il s'engage un peu en profondeur en refoulant l'endoblaste, lequel ne peut pas dans ces conditions former de l'intestin céphalique. La différenciation histologique de ce feuillet est également inhibée. Les ébauches cardiaques rudimentaires occupent leur place primitive des deux côtés du corps. La plaque médullaire reste étalée. Les parties troncales sont sensiblement raccourcies et seulement quelques somites parviennent à s'individualiser. En ce cas, on ne retrouve aucune trace de la ligne primitive en arrière. (2) Quoique la configuration générale de la région céphalique soit comparable, l'état du développement des ébauches est nettement meilleur. Malgré l'absence de l'intestin céphalique, la cytodifférenciation de l'endoblaste est normale. Les ébauches cardiaques paires parviennent à se différencier et souvent se rapprochent de la ligne médiane et se placent au-dessus du rhombencéphale comme chez les omphalocéphales typiques. Le tube nerveux est déjà plus typique, la chorde dorsale est bien différenciée et le nombre de somites normal. Toutes ces formations convergent subitement en une masse cellulaire apparemment homogène qui rappelle le bourgeon tronco-caudal. (3) L'intestin céphalique n'est fermé qu'en avant du cerveau, plus en arrière l'endoblaste, correspondant à la voûte de l'intestin, est repoussé vers le bas par les vésicules cérébrales dont les parois sont plissées irrégulièrement. La seule anomalie importante du tronc est que les rangées somitiques s'accroissent parfois en arrière et donnent naissance à une lignée de somites médians sous la chorde. Rarement, celle-ci s'intercale entre la chorde et le tube neural. La chorde est raccourcie et trop massive et se termine à ce niveau par un épaississement en massue, tandis que les somites médians ne forment bientôt plus qu'une sangle somitique sous le plancher de la moelle.

La topogénèse des embryons traités à la neurulation n'est presque plus atteinte par l'action du LiCl. Tout au plus, le cœur peut prendre une forme atypique et occasionnellement on retrouve des somites médians postérieurs. Seul le cerveau, en particulier l'acréncéphale, est encore réellement réceptif au LiCl. Ses atteintes sont de types disparates. Elles se traduisent soit par des irrégularités de la forme de l'encéphale, soit par sa réduction quantitative. Les ébauches oculaires généralement mal conformées sont dans ce dernier cas toujours absentes.

Conclusions. La sensibilité au LiCl diminue au cours du développement. Aux stades jeunes, le LiCl empêche la formation des parties axiales. A considérer la gravité des effets, ce cas est comparable à celui des embryons lithinés amorphes de *Rana fusca* que l'ASTEELS⁹ a signalés. L'ébauche neurale est la plus touchée et toujours la première à présenter des malformations. Cette extrême susceptibilité s'explique probablement par l'ampleur des

¹ Travail subventionné par le Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

² W. LANDAUER, Poultry Sci. 8, 301 (1929).

³ J. F. NAZ et O. RULON, Anat. Rec. 96, 555 (1946).

⁴ D. A. T. NEW, J. Embryol. exp. Morph. 3, 326 (1955).

⁵ E. J. HOWARD, J. Cell. comp. Physiol. 41, 237 (1953).

⁶ J. GALLERA et G. NICOLET, Exper. 17, 134 (1961).

⁷ D. A. T. NEW, J. Embryol. exp. Morph. 7, 146 (1959).

⁸ L. G. BRITT et H. HERMANN, J. Embryol. exp. Morph. 7, 66 (1959).

événements morphogénétiques et histogénétiques dont le cerveau est le siège durant cette période du développement. Du mésoblaste axial, le matériel chordal est le premier à s'individualiser, contrairement à ce qu'on observe chez les amphibiens. La conversion du matériel chordal en somites observée chez les amphibiens (LEHMANN¹⁰; PASTEELS⁹) ne se rencontre jamais chez le poulet.

Corrélativement à l'importance de l'atteinte, l'expansion du mésoblaste extra-embryonnaire, qui engendre l'aire vasculaire, est plus ou moins bloquée en cours de progression.

Summary. The young blastoderms cultivated *in vitro*, by the method of NEW, slightly modified, grow ab-

normally on a medium of albumen mixed with LiCl solution. It acts in the first place upon the morphogenesis, secondarily upon the differentiation of organs, if they are able to develop.

G. NICOLET

Laboratoire d'Embryologie expérimentale à l'Institut d'Anatomie de l'Université de Genève (Suisse), le 2 mai 1961.

⁹ J. PASTEELS, Arch. Biol. 56, 105 (1945).

¹⁰ F. E. LEHMANN, Roux Arch. Entw. Mech. 136, 112 (1937).

Cytochrome Oxidase Activity in Skeletal Muscle and the Diaphragm of Intermittently Starving Rats

Previous findings from our laboratory revealed that, in rats adapted to intermittent starvation, there are a number of functional and morphological changes¹. The energy metabolism of these animals is characterized by an increase in QO_2 of tissues² and in the basal oxygen consumption *in vivo*³. We investigated, therefore, whether these changes are reflected in the activity of the terminal respiratory enzyme—cytochrome oxidase—particularly in skeletal muscle.

The enzyme activity was estimated manometrically, using the method described by SCHNEIDER and POTTER⁴ at a temperature of 39°C. In experiments with skeletal muscle, the rat was sacrificed, skinned and, after evisceration, the fat was mechanically separated. The muscles and skeleton were homogenised in distilled water (1:9) by the procedure described by JÁNSKÝ⁵ in an ice-cooled Turmix-homogenizer and aliquot portions in a Potter-Elvehjem homogenizer. The skeleton has, according to preliminary experiments, a minimal cytochrome oxidase activity. To the diaphragm distilled water was added, one hundred times its weight. In the homogenates, the nitrogen was estimated by the Microkjeldahl method. All animals were included in the experiment after 24 h fasting; before fasting the animals received a weighed ration.

Male rats, Wistar strain, were used. Some of the animals were adapted to intermittent starvation as follows: during the first two weeks, they were fed on alternate days; during the subsequent two weeks, three times a week, and for the remainder of the experiment (2–6 weeks) only twice a week. The total caloric intake of these animals was by about 30–40% lower than in *ad libitum* fed controls. Another group was fed daily, for a period of 6–8 weeks, a reduced ration, corresponding to ca. 60% of the caloric intake of the control animals. All groups were fed a standard diet, containing 50% of the caloric volume of carbohydrate, 25% fat and 25% protein⁶.

As demonstrated in the Table, the cytochrome oxidase activity (when calculated in relation to the nitrogen content of the tissue) is significantly higher in intermittently starving animals, both in skeletal muscle and the diaphragm. In rats fed daily a reduced ration, there is practically no change, as compared with the control group.

Among other consequences, intermittent starvation leads to an overall increase of metabolism. As has been shown in a previous paper³, this increase is probably mainly due to the higher nutrient supply during periods of food intake when intermittently starving rats develop

considerable hyperphagia. The greater demands on the metabolism resulting from the intermittent increase of nutrient supplies probably lead to the establishment of a higher metabolic level. Finally a change of the enzyme systems involved, in this case cytochrome oxidase, develops. The results of experiments with rats subjected to simple chronic caloric undernutrition support this assumption. These animals have practically the same food intake as rats adapted to intermittent starvation but no changes in the QO_2 or in the cytochrome oxidase activity can be detected in these animals.

The observed increase of cytochrome oxidase activity in rats accustomed to intermittent starvation is interesting, as it is known that levels of this enzyme decrease with age⁷. Thus, the elevated values found in our experiments, similarly as other findings in rats adapted to this nutritional pattern (growth activity of explanted muscle and liver⁸, higher QO_2 levels of tissues², increased basal oxygen consumption *in vivo*³) correspond to a lower biological age of the animal.

Cytochrome oxidase activity in skeletal muscle and diaphragm of intermittently starving rats (in $\mu\text{l } O_2/\text{mg N/h}$)

Group	Number of animals	Weight g	Skeletal muscles and skeleton	Diaphragm
Controls	12	204.5 ± 7.9	65.01 ± 14.14	759.50 ± 77.59
Intermittent starvation	6	128 ± 9.4	144.95 ± 28.45^b	1304.53 ± 153.71^a
Simple under-nutrition	6	110 ± 7.1	81.10 ± 16.3	828.92 ± 87.14

The figures are averages \pm S.E. ^aThe difference of values as compared with controls is statistically significant for $P < 0.01$. ^b for $P = 0.02$.

¹ P. FÁBRY, Physiol. bohemoslov. 4, 33 (1955). – P. FÁBRY and V. KUJALOVÁ, Naturwissenschaften 45, 373 (1959). – R. PETRÁSEK, Nature (Lond.) 183, 323 (1959). – E. HOLEČKOVÁ and P. FÁBRY, Brit. J. Nutr. 13, 260 (1959). – P. FÁBRY, V. KUJALOVÁ, and R. PETRÁSEK, Nahrung 3, 642 (1959).

² R. PETRÁSEK, Čs. fysiologie 9, 453 (1960).

³ P. FÁBRY, R. PETRÁSEK, and L. KRULICH, Physiol. bohemoslov., in press (1961).

⁴ W. C. SCHNEIDER and V. R. POTTER, J. biol. Chem. 149, 217 (1943).

⁵ L. JÁNSKÝ, Acta Soc. zool. Bohemoslov. 21 (2), 164 (1957).

⁶ P. FÁBRY, Čs. fysiologie 8, 529 (1959).

⁷ H. O. KUNKEL and J. E. CAMPBELL, J. biol. Chem. 198, 229 (1952).

⁸ E. HOLEČKOVÁ, O. POUPA, and P. FÁBRY, Physiol. bohemoslov. 8, 15 (1959).