

Dans quelles conditions l'amnios de l'embryon de poulet peut-il se former en culture *in vitro*?¹

En 1932, WADDINGTON², le premier, cultiva des blastodermes sur un substratum demi-solide composé de jus embryonnaire et de plasma. D'autres chercheurs (SPRATT³, WOLFF et SIMON⁴) ont par la suite employé un milieu à base de gélose enrichi de substances nutritives diverses. Dans tous ces cas le blastoderme est prélevé seul et étalé sur le substratum. Sa face ventrale est appliquée directement contre l'agar, alors que sa face externe est en contact direct avec l'air.

Depuis 1955, une nouvelle technique introduite par NEW⁵ donne des résultats plus satisfaisants à plusieurs points de vue. Le blastoderme est détaché du vitellus avec sa membrane vitelline, laquelle est tendue sur une mince couche d'albumen. Le blastoderme adhérant à la face interne de la membrane vitelline est en position renversée, sa face ventrale tournée vers le haut. Grâce à la présence de la membrane vitelline, l'expansion du blastoderme est parfaitement normale. L'endoblaste d'autre part, sécrète du liquide qui recouvre rapidement la face ventrale.

Sur des substrats à base d'agar, le blastoderme n'est pas recouvert de liquide, la croissance périphérique insignifiante. L'observation histologique de ces embryons montre que les feuillets se sont épaissis faute d'extension et que les structures embryonnaires ont subi un net aplatissement. Dans ces conditions, il appert que l'absence totale d'amnios est en premier lieu imputable à des facteurs mécaniques.

Nous avons introduit une légère variante dans le procédé de NEW⁵. Le blastoderme a effectivement sa face ventrale disposée en haut, mais au lieu de placer un anneau sur la face interne de la membrane vitelline, nous plaçons la membrane vitelline par-dessus un premier anneau sur lequel un second plus large vient s'emboiter (GALLERA et NICOLET⁶). La membrane vitelline passe entre les deux anneaux (voir Figure 1 en haut). Rapidement la face externe de la membrane vitelline se colle sur le bord de l'anneau intérieur. Malgré des conditions de culture apparemment favorables, l'amnios est toujours déficient ou fait totalement défaut. Tout au plus, certains embryons, parfois âgés, ont un capuchon céphalique qui s'arrête derrière les vésicules optiques, sa progression a donc cessé, mais la partie formée subsiste. La plupart de ceux qui ont été fixés après 48 h d'incubation totale ont des replis amniotiques qui s'élèvent de chaque côté de la tête, tandis que le pro-amnios proprement-dit manque. En examinant des spécimens fixés plus tardivement, on constate que ces replis ont disparu. Plus particulièrement, chez les embryons transplantés au début de la neurulation (stades 7 ou 8 de HAMILTON et HAMBURGER⁷), on retrouve souvent des vestiges du capuchon céphalique sous forme d'un repli étroit arciforme repoussé en avant. En l'absence de l'am-

nios, la courbure du corps embryonnaire s'amorce à peine (voir Figure 2). Quelquefois, même s'il ne reste aucune trace du capuchon céphalique, nous avons clairement observé un petit capuchon caudal isolé, précisément à un stade où sa formation devait intervenir.

La croissance du bord d'enveloppement est rapide et le corps embryonnaire est, de tout son poids, appliqué contre la membrane vitelline. Cette expansion active empêche-t-



Fig. 2. Embryon cultivé selon la méthode classique de NEW. Le corps embryonnaire est normalement développé, cependant l'amnios n'est représenté que par un repli rudimentaire en forme de croissant, et situé loin en avant de la tête.



Fig. 3. Embryon cultivé sur l'albumen, sa face ventrale tournée vers le bas. Aussi bien le corps embryonnaire que l'amnios sont normalement développés. À remarquer l'ombilic amniotique dont les dimensions et la position correspondent au stade du développement atteint par l'embryon.

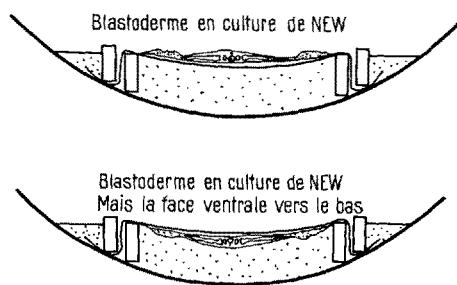


Fig. 1. Deux procédés de culture du blastoderme sur l'albumen.

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

² C. H. WADDINGTON, Phil. trans. Roy. Soc. B 222, 179 (1932).

³ N. T. SPRATT, J. exp. Zool. 106, 345 (1947).

⁴ E. T. WOLFF et D. SIMON, C. R. Acad. Sci. 241, 1994 (1955).

⁵ D. A. T. NEW, J. Embryol. exp. Morph. 3, 326 (1955).

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

⁷ H. HAMILTON et V. HAMBURGER, J. Morph. 88, 49 (1951).

elle toute formation de replis aux dépens du feuillet superficiel ou bien le capuchon céphalique ne parvient-il pas à envelopper la tête faute d'espace disponible ? Ce sont les éventualités que suggère l'expérience que nous avons ultérieurement entreprise.

Cette expérience consiste à placer le blastoderme en position normale, sa face endoblastique contre de l'albumen qui doit être fluide (voir Figure 1 en bas). Dans cette nouvelle position, l'embryon et l'amnios se développent normalement (Figure 3). Nous avons pu établir quelles sont les différences apportées par ce nouveau procédé. La membrane vitelline reste moins tendue, car sa face interne de nature différente ne colle pas à l'anneau intérieur. Le contact de l'endoblaste avec l'albumen ralentit l'expansion périphérique, fait qui explique vraisemblablement que dans le bourrelet fortement basophile qui précède le bord d'enveloppement sensu stricto (GALLERA et OPRECHT⁸), les cellules ectoblastiques s'accumulent en quantité excessive. Par conséquent, le blastoderme est moins tendu et une cuvette se creuse entre le blastoderme et la membrane vitelline. Cet espace laisse probablement la voie libre aux mouvements de l'amnios. Une autre expérience nous a montré de manière probante qu'un contact direct avec l'albumen gêne les mouvements des feuillets embryonnaires. Pour préciser, si l'on injecte de l'albumen entre la membrane vitelline et la face dorsale du blasto-

derme, l'amnios qui dans ces conditions aurait dû se former reste abortif.

On aurait pu penser que l'amnios formé assurerait une survie prolongée à ces embryons cultivés *in vitro*. Il n'en est rien, car d'autres facteurs plus prépondérants interviennent. En effet, la circulation reste déficiente (NEW⁹) et, comme d'autres l'ont signalé (NEW⁹, BRITT et HERMANN¹⁰), un rapide déficit de l'anabolisme protéique provoque irrémédiablement leur mort.

Summary. The amnion was never before observed to form *in vitro* culture. A slight modification of the classic method of New consists in cultivating the blastoderm in its normal position, the ventral side against the medium. In this new position, the amnion develops normally.

G. NICOLET et J. GALLERA

Laboratoire d'Embryologie expérimentale, Institut d'Anatomie, Université de Genève (Suisse), le 19 septembre 1962.

⁸ J. GALLERA et E. OPRECHT, Rev. suisse Zool. 55, 243 (1948).

⁹ D. A. T. NEW, J. Embryol. exp. Morph. 7, 146 (1959).

¹⁰ L. G. BRITT et H. HERMANN, J. Embryol. exp. Morph. 7, 66 (1959)

COGITATIONES

Eine Methode zur Analyse und quantitativen Auswertung biologischer steady-state-Übergänge

Milieu- und Reizveränderungen lösen bei zeitlich recht-eckigem Verlauf initial überschüssende Reaktionen biologischer Objekte aus, denen die endgültige Einstellung des funktionellen steady-state näherungsweise im Sinne einer *e*-Funktion folgt. Die ursächlichen Mechanismen für diese Vorgänge sind bisher noch nicht befriedigend geklärt. Die Kinetik der fünf möglichen steady-state-Übergänge wird deshalb am Beispiel der Temperatur-Leistungs-Adaptation (PRECHT¹) unter Anwendung von Transportgleichungen der Thermodynamik irreversibler Prozesse (v. BERTALANFFY²) analysiert. – Das Gleichungssystem

$$J_i = \sum_{k=1}^n L_{ik} X_k \quad (i = 1, 2, \dots, n) \quad (1)$$

gibt bei Berücksichtigung der Onsagerschen Reziprozitätsgesetze die linearen Beziehungen zwischen den energetischen «Flüssen» J_i , den chemischen «Triebkräften» X_k und den Koeffizienten L_{ik} (Reaktions-, Diffusions-, Wärmeleitungsgeschwindigkeit u.a.) wieder. Bei Analogsetzung des Ohmschen Gesetzes

$$J = 1/R \cdot U \quad (2)$$

sind an einem geeigneten elektrischen Fließgleichgewichtsmodell (vgl. Schaltbild A) die biologischen steady-state-Übergänge zu reproduzieren und zu analysieren. Dieser permanent von Gleichstrom durchflossene Vierpol mit je einem Widerstand im Ein- und Ausgangszweig und einer Kapazität in Sternschaltung gibt über ein direkt schreibendes Instrument am Ausgangszweig die steady-state-Übergänge der Stromstärke in Kurvenform wieder. Hierbei bleibt die Spannung U_E des Generators in Analogie zu den homoiostatisch geregelten biologischen «Triebkräften»

X_k konstant. Nur die Widerstände R_e und R_a werden in Analogie zur biologischen Reiz- bzw. Temperaturwirkung auf die Koeffizienten L_{ik} verändert. R_e und R_a bilden mit ihren reziproken Werten die an Aufnahme- und Abgabeseite des offenen biologischen Systems wirksamen Koeffizienten L_{ik} summarisch ab. Die Kapazität C ist Abbild der «Speichereinrichtungen» des biologischen Systems für Substrate potentieller chemischer Energie.

Bei der Temperatur-Leistungs-Adaptation haben Poi-kilotheime und isolierte Organe Homiothermer bei tiefer Temperatur T_1 unter Ruhebedingungen den konstanten «Leistungswert» k_1 . Bei den Modellversuchen wird dieser steady-state-Wert dem Energiefluss J des Systems proportional gesetzt: $k_1 \sim J_1$. In Analogie zur Temperaturwirkung auf L_{ik} wird der Widerstand R_{a_1} auf die Grösse R_{a_2} erniedrigt. Nach den Kirchhoff'schen Regeln bestimmt der Quotient R_{a_1}/R_{a_2} die Grösse der initial «überschüssigen» Stromstärke J_2 (k_2). Wird $T_2 - T_1 = 10^\circ\text{C}$ gesetzt, dann ist durch den Quotienten J_2/J_1 bzw. R_{a_1}/R_{a_2} der Temperaturquotient (Q_{10}) des Modellvorganges gegeben. Mit der Zeitkonstanten τ der Kondensatorentladung stellt sich anschliessend der endgültige steady-state-Wert J_{st} der «Temperatur» T_2 ein. Bei Temperatursenkung von T_2 auf T_1 verändern sich die Werte in entsprechender Weise. Die Typen der Temperatur-Adaptation sind in Figur 1 schematisch dargestellt. Im Modellversuch werden die typencharakteristischen Lagen von J_{st} zu J_1 und J_2 durch die jeweiligen Grössenveränderungen von R_{e_1} auf R_{e_2} bestimmt (vgl. Figur 2). Das Flächenintegral der Übergangskurven gibt *quantitativ* die Leistung bzw. Entropieerzeugung des thermodynamisch offenen Systems wieder. Akko-

¹ H. J. PRECHT, *Temperatur und Leben* (Springer, Heidelberg 1955).

² L. v. BERTALANFFY, *Biophysik des Fließgleichgewichts* (Vieweg, Braunschweig 1953).