

La synthèse du DNA dans les cellules germinales de l'ovaire de poulet pendant la dernière semaine de la vie embryonnaire

Dans un travail précédent¹ nous avons démontré, par la méthode de culture organotypique, qu'à 17 jours une importante synthèse de DNA se produit dans les cellules germinales de l'embryon femelle de poulet. Dans le but de mieux comprendre ce phénomène nous avons poursuivi une série d'expériences dans ce domaine, *in vitro* et *in vivo*.

Matériel et méthodes. Les expériences sont faites sur l'ovaire gauche de l'embryon de poulet de la race Leghorn blanche. Pour l'étude *in vitro*, on prélève des bandelettes transversales de la partie moyenne de la gonade d'embryons de 15 jours 0 h à 16 jours 20 h. Ces bandelettes sont cultivées pendant 2 ou 3 jours sur le milieu standard de WOLFF et HAFFEN², additionné de thymidine tritiée à la concentration de 4 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de milieu (A.S. 3 C/mM).

Pour l'étude *in vivo*: (1) Dans des œufs fécondés et incubés pendant 14, 15, 16, 17 ou 18 jours à 39,5 °C on découpe une petite fenêtre dans la coquille, au niveau de la chambre à air. Les œufs sont fixés en position verticale avec la fenêtre dirigée vers le haut. Sur la membrane de la poche à air 100 μCi de solution aqueuse de thymidine-³H (6 C/mM, 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) sont déposés. Après $1/2$ h 100 μl de solution physiologique de Hanks sont ajoutés pour éviter la dessication de la solution de thymidine. Après 1 h, les ovaires sont fixés.

(2) Des œufs fécondés et incubés pendant 15 jours et 7 h reçoivent 50 μCi de thymidine-³H de la même façon. Ceci est répété encore 7 fois, toutes les 8-10 h (la dernière fois après 17 jours et 17 h d'incubation). La fixation des ovaires se fait 2 ou 41 jours après l'élosion de l'embryon ainsi traité.

La fixation des ovaires est effectuée à l'aide d'alcool acétique à 4 °C pendant 18 h. Les ovaires sont inclus dans la paraffine et coupés à 5 μ . Après déparaffinage, les coupes sont réhydratées et les précurseurs acidosolubles sont extraits par l'acide perchlorique à 2% à 0 °C pendant 20 min. Sans séchage préalable pour ne pas détériorer les structures cytoplasmiques et nucléaires, les coupes sont immergées directement dans l'émulsion Ilford L4 diluée par moitié d'eau distillée. La durée de l'exposition dans l'obscurité est de 10, 30 ou 60 jours. Après développement, les autoradiographies sont colorées à l'haematoxyline ferrique de Groat et contre-colorées à l'éosine ou au fast green. Pour l'étude quantitative, les cellules germinales marquées et non marquées de chaque huitième coupe sont comptées.

Résultats. La Figure 1 représente le phénomène intégral obtenu en cultivant des explants pendant 2-3 jours sur le milieu marqué. Le taux de l'incorporation de thymidine-³H s'élève parfois jusqu'à 80%.

La Figure 2 représente l'incorporation dans le noyaux des cellules germinales après un pulse d'une heure *in vivo*. Comme nous avions observé auparavant *in vitro*¹, il y a *in vivo* aussi un minimum d'incorporation à 14 jours et un maximum à 17 jours, avec des valeurs intermédiaires à 15 et 16 jours.

Chez les ovaires ayant reçu un traitement par injections répétées *in vivo*, 90-95% des cellules germinales en prophase de méiose sont marquées (voir Figures 3 et 4).

Discussion. Avant de discuter la signification de nos résultats, rappelons les limites de l'étude quantitative en autoradiographie pour le matériel étudié:

(1) *In vitro* surtout, il est parfois difficile de reconnaître une cellule germinale dans une autoradiographie

car, lorsque son noyau est fortement marqué, les détails nucléaires sont cachés derrière un nuage de grains noirs. *Ipsa facto*, le stade dans lequel se trouve la cellule germinale est alors impossible à déterminer. (2) La longueur du cycle mitotique des cellules germinales de l'embryon de poulet, à différents stades de la vie embryonnaire, n'étant pas connue, il n'est pas exclu que certaines cellules après avoir achevé leur synthèse de DNA *in vitro*, se divisent en deux cellules-filles qui sont - elles - marquées sans avoir été elles-mêmes en phase S.

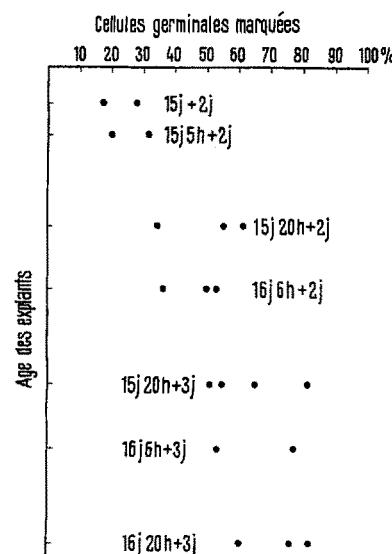


Fig. 1. Culture organotypique de bandelettes transversales de la partie moyenne de l'ovaire. Le temps avant le signe + indique l'âge de l'embryon dont on a prélevé un morceau d'ovaire. Le temps après le signe + représente la durée en culture organotypique. Chaque point provient d'un embryon différent.

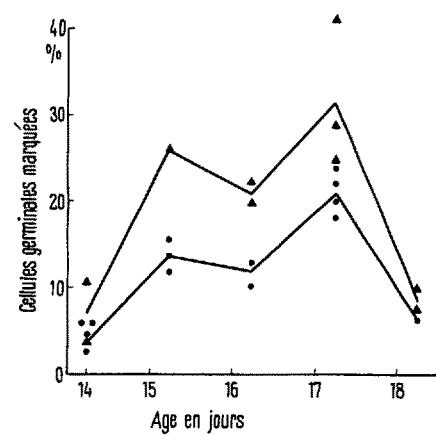


Fig. 2. «Pulse» de thymidine-³H à différents âges, *in vivo*, pendant 1 h. Chaque point provient d'un embryon différent. ● = 10 jours d'exposition autoradiographique, ▲ = 30 jours d'exposition autoradiographique. Les deux courbes passent par les taux moyens.

¹ M. CALLEBAUT et R. DUBOIS, C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 267, gr. 12 (1965).

² E. WOLFF et K. HAFFEN, Tex. Rep. Biol. Med. 10, 463 (1952).

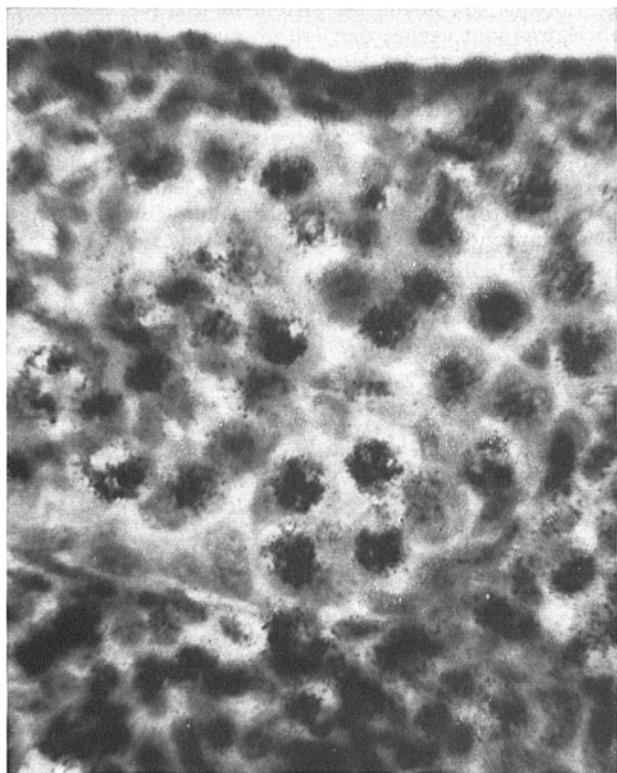


Fig. 3. Autoradiographie d'un ovaire gauche d'un poussin de 2 jours ayant reçu des injections répétées de thymidine-³H à 15, 16 et 17 jours. La presque totalité des cellules germinales est marquée. Les cellules de la médullaire sous-jacente sont également fortement marquées. Coloration à l'haematoxyline ferrique, éosine. Exposition autoradiographique: 30 jours. $\times 1060$.

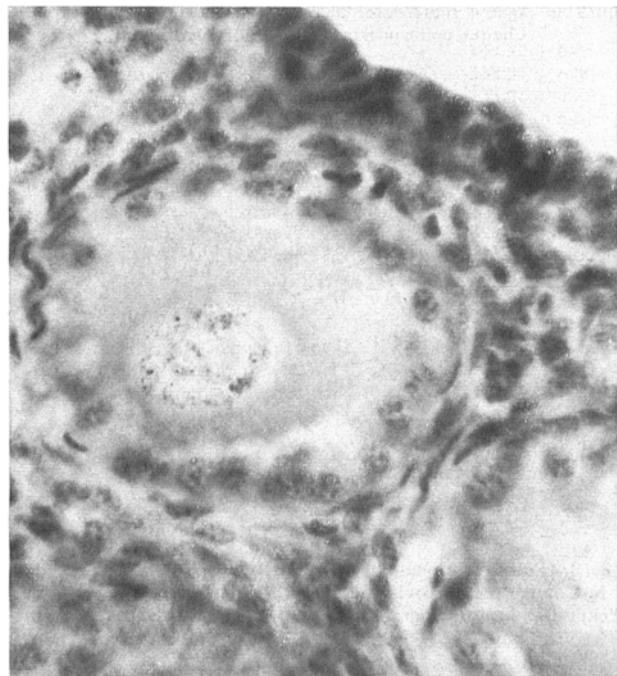


Fig. 4. Autoradiographie d'un ovaire de poulet de 41 jours ayant reçu le même traitement. Dans le noyau de l'oöcyte on reconnaît les chromosomes plumeux marqués. Le cytoplasme de l'oöcyte n'est pas marqué. Coloration à l'haematoxyline ferrique et fast green. Exposition autoradiographique: 60 jours. $\times 1060$.

Cela étant, nous pouvons penser que la synthèse du DNA observée à 14, 15, 17 et 18 jours peut être due à 2 phénomènes différents:

(1) Une ultime synthèse prémitotique du DNA dans les cellules qui deviennent, à ce moment, de véritables oocytes primaires avec, probablement, une quantité de DNA au niveau tétraploïde. En effet, la première division méiotique ne s'achève que des mois ou des années plus tard, au moment de l'ovulation. Chez les plantes et animaux étudiés on a constaté, par des procédés cytochimiques, que la quantité de DNA et protéines basiques des méiocytes double au stade leptotène ou avant celui-ci³. (2) Une synthèse de DNA prémitotique dans les oögonies, juste avant leur division.

Lors d'une étude histologique parallèle nous avons pu constater: A 14 jours: l'apparition, en grand nombre, de cellules germinales à noyau caractéristique (appelé noyau réticulé). Ce noyau a l'aspect d'une vésicule presque vide et contient de fins granules chromatiniens ramassés autour d'un nucléole central d'où partent des fibrilles très fines vers la membrane nucléaire. La membrane nucléaire, dont la partie interne est tapissée de granules, est très fine mais très nette. A ce stade, les cellules germinales n'incorporent jamais la thymidine-³H.

A partir de 15 jours: on trouve exclusivement des cellules germinales en division dans les cordons germinaux les plus éloignés du centre du cortex de l'ovaire. Dans cette partie centrale, au contraire, on observe déjà quelques cellules germinales au stade leptotène. L'activité mitotique dans les bords de l'ovaire continue parfois jusqu'à la fin de la vie embryonnaire.

A 18 jours: de très nombreuses cellules germinales en prophase de méiose (leptotènes et zygotènes) apparaissent et, parallèlement, l'incorporation décroît rapidement.

Conclusions. L'allure de la courbe obtenue *in vivo* par un pulse unique (à différents jours) est analogue à celle obtenue *in vitro* par culture organotypique sur milieu marqué¹. Le phénomène global, soit *in vitro* par culture prolongée, soit *in vivo* par des «pulses» répétés de thymidine-³H, nous amène à conclure que la plus grande partie du DNA des oocytes qui se transformeront plus tard en œufs se synthétise à 15, 16 et surtout à 17 jours. En effet, selon la théorie de WALDEYER⁴ au moment de l'éclosion chez les oiseaux carinates l'oögenèse (c'est-à-dire la formation des nouvelles cellules germinales par divisions mitotiques) a déjà pris fin. On peut prévoir que ces jours de la vie embryonnaire seront les plus propices pour influencer la descendance des embryons femelles par des substances chimiques ou des agents physiques⁵.

Summary. DNA synthesis in the germ cells of the ovary of the chicken embryo during the last week of incubation is studied *in vivo* and *in vitro* by tritium autoradiography.

M. CALLEBAUT

Section de Biochimie cellulaire, Département de Radiobiologie, Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire, Mol (Belgique), 28 novembre 1966.

³ M. M. RHOADES, *The Cell*, (Ed. J. BRACHET and S. E. MIRSKY, Academic Press, London 1961) vol. III.

⁴ W. WALDEYER, *Eierstock und Ei*, (Engelmann, Leipzig 1870).

⁵ Ce travail a pu être effectué grâce aux subsides du Fonds de la Recherche Scientifique Fondamentale Collective.