

The qualifying term 'paradoxical' can be applied to this type of microgyric cortex found in association with intra-uterine hydrocephalus, if one would expect to find gyri wider than normal, flattened by the increasing volume of fluid in the ventricular system, as is usually found in hydrocephalus of sufficient severity which has begun after birth, and not during intrauterine life. It is known that the association of neural malformations known as the Arnold-Chiari syndrome can appear early in fetal life (DUCKETT²). It is therefore presumed that the first steps in the production of the hydrocephalus are occurring simultaneously with the formation of gyri. Thus, the cerebral cortex would be prey to a derangement of the gyri-formative mechanisms, which would result in the formation of many small gyri as a compensative factor for the abnormal dilation of the developing brain.

Résumé. Le cortex cérébral, dans les cas d'hydrocéphalie ayant débuté durant la vie foetale, offre de petites circonvolutions. Il est surprenant qu'un cerveau qui grossit à la suite d'une pression excessive présente de petites circonvolutions au lieu de grosses circonvolutions aplaties contre la surface interne du crâne. Cette microgyrie paradoxale associée à l'hydrocéphalie indiquerait une origine prénatale.

S. DUCKETT

*Department of Neurology, Jefferson Medical College, Philadelphia (Pennsylvania 19107, USA),
7 May 1968.*

² S. DUCKETT, *Acta Neuropath.*, Berlin 7, 175 (1966).

Extracorporal Development of Quail Oocytes

The homograft reaction does not develop in the embryo until a late stage. Therefore experimental embryologists and pathologists have been able to demonstrate growth on the chick chorioallantoic membrane of normal animal tissues and of a variety of tumours, some of which have also been cultured in vitro¹.

In the present work it has been observed that very young oocytes of quail embryos may develop normally into ovarian tissue, when cultured in vitro for some time and subsequently transplanted on the chick chorioallantoic membrane.

Fertile eggs from Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) are incubated at 39°C. After 10 or 13 days of incubation, the left ovary of the female embryos is removed. Its central part is excised and cultivated for 5 or 24 h on agar jelly, according to the technique of WOLFF and HAFFEN². These fragments are thereafter transplanted on the chorioallantoic membrane of 7-day-old chick embryos according to the method of HARRIS³.

After 11 days of growth on this living substrate, the

fragments of quail ovary are fixed in acetic alcohol (1:3) at 4°C for 18 h, embedded in paraffin and sectioned at 5 μ thickness.

After deparaffination and rehydration, the sections are coloured with an aqueous solution of 1% toluidin blue. The cortex of the ovarian transplants contains normally developed intrafollicular oocytes at the stage of pre-vitellogenesis (Figure 1).

Their aspect (Figure 2) is similar to that of the oocytes found in young female quails of corresponding age. The

¹ C. P. DAGG, D. A. KARNOFSKY and J. RODDY, *Cancer Res.* 16, 589 (1956).

² E. T. WOLFF and K. HAFFEN, *Texas Rep. Biol. Med.* 10, 463 (1952).

³ J. J. HARRIS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 76, 764 (1958).

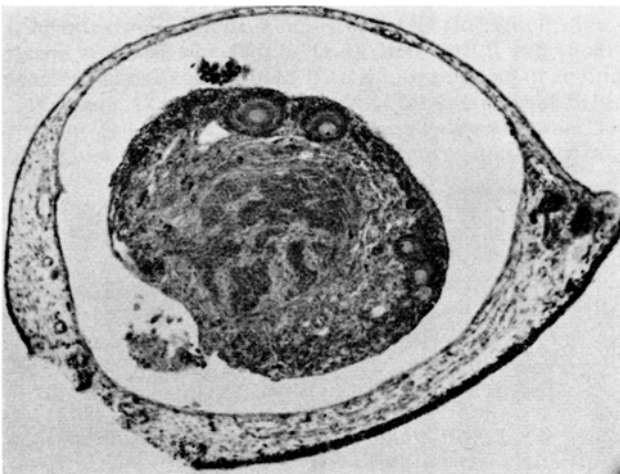


Fig. 1. Section through a piece of ovary removed from a 10-day-old quail embryo, cultured for 5 h in organ culture and grown in a chick chorioallantoic membrane during 11 days. The cortex contains several well-developed intrafollicular oocytes. $\times 110$.

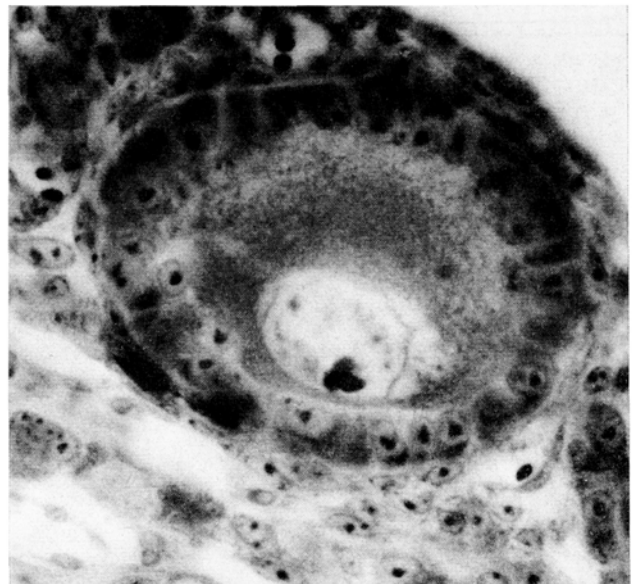


Fig. 2. High power view of one of the oocytes of Figure 1. Primary polarity, by eccentric position of the germinal vesicle in the oocyte, is obvious. The nucleolus presents vacuolization and epinucleolar buds. The follicle cells and other somatic cells contain a large central or subcentral chromatin granule. $\times 1000$.

first oocytes in leptotene stage of meiosis appear in the central part of the ovary of the quail embryo after 10 days of incubation (unpublished results). At the moment of hatching (approximately after 16 days incubation) the first intrafollicular oocytes are seen. Thus in our experimental conditions, oocytes of quail appear to perform their differentiation from one of the earliest stages of development to that of advanced previtellogenesis, corresponding to a very large cytoplasmic growth. This marvellously rapid development (one of the most accelerated among higher vertebrates), together with the possibility of direct application of chemical or physical agents on the pieces of ovaries, may be of great interest for investigations of oocyte metabolism. The present study also demonstrates that the vital potencies of the developed oocytes have not been irreversibly altered by the passage through organ culture, their extracorporal development being apparently independent of the physiological state of the much younger chick embryo on which they have been transplanted⁴.

Zusammenfassung. Stücke des Eierstocks von 10 oder 13 Tage alten Wachtelembryonen werden 5 oder 24 h in Organkultur gezüchtet und dann auf die Chorioallantois-membran 7 Tage alter Hühnchen übertragen. Nach elf-tägigem Wachstum beobachtet man eine Entwicklung von intrafollikulären Oozyten in Previtellogenese.

M. CALLEBAUT

Departement Radiobiologie, Studiecencentrum voor Kernenergie, Mol (Belgium), 3 July 1968.

⁴ This work was carried out thanks to grants from the Belgian 'Fonds voor Fundamenteel Kollektief Wetenschappelijk Onderzoek'.

Action de la pepsine sur un flagelle du type «9 + 1»

MONNERON et BERNHARD¹ ont montré qu'une certaine action enzymatique spécifique est possible sur coupes de tissus inclus en milieu non hydrosoluble, tel que l'Epon, ce que permet une localisation très précise du phénomène au niveau de la microscopie électronique. Plus récemment, GIVAN et coll.² ont réussi de faire agir la pepsine sur le capsid protéique de virus inclus dans un mélange d'Epon-Araldite.

Un essai d'extraction enzymatique a été effectué sur des flagelles du spermatozoïde de la planaire *Dugesia tigrina*, dans le but d'en identifier quelques propriétés de son cylindre central unique. Ces flagelles, comme chez d'autres espèces de Platyhelminthes, sont du type «9 + 1» et son ultrastructure pose des problèmes de dynamique bien intéressants. Une étude détaillée de ces flagelles sera présentée ailleurs³.

Nous avons utilisé la technique décrite par MONNERON et BERNHARD¹. Des exemplaires de *D. tigrina* sont fixés en tétroxyde d'osmium à 1% en tampon phosphate (Sörensen) pH 7,3 pendant 1 h, deshydratés dans l'alcool et l'oxyde de propylène et inclus en Epon⁴. Des coupes ultrafines sont obtenues avec un microtome Porter-Blum. Pour l'extraction enzymatique, les coupes sont préalablement oxydées pendant 20 min dans une solution à 10% d'acide périodique, lavées dans l'eau distillée et flottées dans une solution de pepsine (Sigma, 2 fois cristallisée) à 0,2%, pH 1,2 dans l'acide chlorhydrique 0,1M. La digestion est faite à 38°C pendant 30, 40 et 60 min. Les coupes traitées sont alors lavées dans l'eau distillée et recueillies sur des grilles dépourvues de membrane-support. Des coupes témoins sont procédées à la fois, et sous les mêmes conditions que celles traitées, excepté que l'incubation est faite dans une solution de chlorure de sodium à 0,2%. Toutes les coupes – traitées et témoins – sont alors contrastées pendant 15 min par immersion dans l'acétate d'uranyle, plus flottées 5 min dans le citrate de plomb, selon les procédés habituels. L'étude des coupes est faite dans l'Elmiskop I Siemens sous 80 kV.

Résultats. L'action de la pepsine est inefficace ou à peine perceptible pour 30 min d'exposition, comme le

montre la Figure 1; les flagelles (F) restent avec son structure normale, tel comme l'on voit aussi dans le témoin (Figure 2). Les éléments constitutifs d'un flagelle sont indiqués ici dans la coupe témoin: cylindre central (cc), fibrilles périphériques (fp) et rayons (r). Dans le cylindre central on peut reconnaître l'élément axial dense, circonqué par la zone intermédiaire (anneau clair) plus la gaine corticale (anneau dense). On voit aussi dans la Figure 2 une coupe transversale du corps du spermatozoïde, contenant noyau (N), mitochondrie (m) et système de microtubules (mt) sous la membrane plasmique.

À la suite de 40 min de contact, l'action de la pepsine est déjà bien marquée, comme l'on voit dans la Figure 3: autant que la membrane du flagelle soit assez résistante, les 9 paires périphériques se présentent bien altérés. Il arrive souvent que la pepsine agit sur l'Epon lui-même, causant des petits trous (flèches). Toutefois, le cylindre central et les rayons y associés sont encore nets. Une dilatation de la membrane flagellaire contenant des vésicules (v) est indiquée dans les Figures 3 et 4. Par comparaison avec son témoin (Figure 4), on observe une perte du contraste de la coupe traitée, surtout des fibrilles périphériques.

Au bout d'1 h, la digestion est fort poussée (Figure 5), et l'Epon se présente souvent déchiré. Bien que le témoin (Figure 6) soit maintenant un peu altéré, la comparaison avec la coupe traitée est remarquable: on observe ici, dans les 3 flagelles discernibles de la coupe, une désorganisation des éléments fibrillaires, qui forment un amas peu dense entouré par la membrane du flagelle. Dans le cylindre central, seulement la gaine corticale avec les rayons persiste encore reconnaissable (Figure 5, flèches).

¹ A. MONNERON et W. BERNHARD, *J. Microscopie* 5, 697 (1966).

² K. F. GIVAN, C. TURNBULL and A. M. JÉZÉQUEL, *J. Histochem. Cytochem.* 15, 688 (1967).

³ M. SILVEIRA, *J. Ultrastruct. Res.*, sous presse.

⁴ J. H. LUFT, *J. biophys. biochem. Cytol.* 9, 409 (1961).