

## Différence de réactivité à l'inducteur neurogène entre l'ectoblaste de l'aire opaque et celui de l'aire pellucide chez le Poulet<sup>1</sup>

Le problème de la durée de l'action inductrice nécessaire à déclencher dans l'ectoblaste la formation d'une ébauche neurale n'a été jusqu'à présent qu'à peine abordé chez les Oiseaux. En 1965<sup>2</sup>, nous avons constaté que chez des jeunes blastodermes de Poulet, l'inducteur neurogène normal, à savoir le nœud de Hensen, doit rester environ 9 h en contact avec l'ectoblaste de l'aire opaque pour que ce dernier réagisse dans tous les cas et forme une ébauche neurale capable de poursuivre ensuite son développement d'une façon autonome et plus ou moins normale. Récemment, LEIKOLA et McCALLION<sup>3</sup> ont examiné la réactivité de l'ectoblaste de l'aire pellucide à l'action inductrice d'un fragment de foie fixé à l'alcool. Après 4 ou 6 h de contact, cet hétéroinducteur a été enlevé, le grand fragment de l'ectoblaste sous-jacent excisé et cultivé *in vitro* sur le milieu nutritif semi-solide, préparé selon le procédé de BUTROS<sup>4</sup>. Après 4 h de contact, un seul fragment ectoblastique sur 9 s'est différencié en ébauche neurale rudimentaire et atypique, tandis que 6 h de l'action inductrice se sont révélées suffisantes pour provoquer la neuralisation dans 63% des cas. Par conséquent, nous avons cru utile d'étudier comparativement la réactivité de l'ectoblaste de l'aire opaque et pellucide.

Nos expériences sont faites sur des blastodermes au stade de la ligne primitive longue (st. 3+) cultivés *in vitro* selon la technique de NEW<sup>5</sup>. Les structures neurales induites dans l'aire pellucide fusionnent généralement avec le système nerveux de l'embryon hôte, de sorte que leur développement est visiblement influencé par ce dernier. Afin d'éviter cet inconvénient, nous avons procédé de la façon suivante: la partie antérieure de la ligne primitive est excisée et ce greffon est appliqué, sa face ventrale, contre l'ectoblaste de l'aire pellucide à la hauteur de la région latérale du croissant antérieur de Duval. Un deuxième greffon, prélevé sur un blastoderme du même âge, est appliqué contre l'ectoblaste de l'aire opaque en avant de l'aire pellucide. Pour empêcher l'élargissement de la blessure, un grand carré de millipore est posé sur la région excisée et recouvre la majeure partie de l'aire pellucide. Dans ces conditions, la formation des structures axiales de l'embryon hôte est fortement inhibée, tandis que la partie postérieure de la ligne primitive fournit, comme dans le développement normal, de nombreux îlots sanguins. Après un laps de temps variable, de 2 à 10 h, les greffons sont détachés du blastoderme. Dans les cas où le temps de contact du greffon avec l'ectoblaste était soit court soit très long, nous n'avons implanté qu'un seul greffon, situé dans l'aire pellucide dans le premier cas et dans l'aire opaque dans

le second. Enfin, dans quelques cas, une petite portion du greffon a été par mégarde laissée sur place et ces greffons n'ont pas pu être pris en considération. Le lendemain de l'opération, les blastodermes ont été fixés, examinés *in toto* et sur des coupes séries. Le Tableau résume nos résultats.

Comme nous le voyons, un contact de 2 à 3 h entre le greffon et l'ectoblaste de l'aire pellucide a suffi pour provoquer une induction neurale rudimentaire dans quelques cas, tandis qu'à partir de 6 h cet ectoblaste répond toujours à l'action inductrice et forme une ébauche cérébrale typique (Figure 1). En revanche, l'ectoblaste de l'aire opaque n'est capable de donner naissance à une ébauche neurale rudimentaire qu'après 7 h de contact avec le greffon (Figure 2). Toutefois, après 9 h nous avons obtenu des inductions neurales dans l'aire opaque dans tous les cas. Mentionnons pourtant que les structures neurales induites dans l'aire opaque étaient relativement petites et se caractérisaient par la prolifération exagérée de la crête neurale, dont les éléments restent massés sous la plaque neurale.

L'analyse statistique révèle que la différence entre les fréquences des inductions neurales déclenchées après 7 h respectivement dans l'aire pellucide et opaque est hautement significative, en effet  $X^2 = 5,5$ , c'est à dire la probabilité que nos résultats soient dus au hasard est moindre que  $1/40$ .

<sup>1</sup> Travail subventionné par le Fonds national Suisse de la Recherche scientifique.

<sup>2</sup> J. GALLERA, *Experientia* 21, 218 (1965).

<sup>3</sup> A. LEIKOLA et D. J. McCALLION, *Experientia* 23, 869 (1967).

<sup>4</sup> J. BUTROS, *J. exp. Zool.* 152, 57 (1963).

<sup>5</sup> D. A. T. NEW, *J. Embryol. exp. Morph.* 3, 326 (1955).

Temps de l'action inductrice	Nombre des greffons		Nombre des inductions neurales	
	Aire pellucide	Aire opaque	Aire pellucide	Aire opaque
2 h	3	—	1 (33,3%)	—
3 h	4	—	2 (50%)	—
4 h	17	—	11 (64,7%)	—
6 h	12	11	12 (100%)	0
7 h	9	8	9 (100%)	3 (37,5%)
9 h	8	10	8 (100%)	10 (100%)
10 h	—	3	—	3 (100%)



Fig. 1. Coupe d'une ébauche cérébrale induite dans l'aire pellucide après 6 h de contact entre le greffon et l'ectoblaste.  $\times 130$ .



Fig. 2. Coupe transversale d'une plaquette neurale formée dans l'ectoblaste de l'aire opaque soumis à un stimulus inducteur d'une durée de 7 h. A remarquer le développement excessive de la crête neurale.  $\times 130$ .

Le retard de l'induction neurogène dans l'aire opaque est au moins en grande partie imputable à la différence de structure existant entre l'ectoblaste de l'aire opaque et celui de l'aire pellucide. Une étude ultrastructurale mise en œuvre présentement dans notre laboratoire laisse entrevoir des différences de structure nettement perceptibles au moins dès le stade de la jeune ligne primitive. Cette différence réside évidemment dans le fait que ces deux sortes d'ectoblaste ont une destination totalement différente, l'ectoblaste périphérique participant par la suite à la formation des annexes foetales. Cet ectoblaste, du fait de ses tendances intrinsèques, présente donc une certaine inertie au stimulus inducteur. D'après nos données plus anciennes (GALLERA<sup>2</sup>), la transformation de cet ectoblaste en ectoblaste qui aura le caractère de celui de l'aire pellucide ne s'observe qu'après 4 h environ de contact avec l'inducteur. Après 6 h, il a pris l'aspect d'un jeune neurectoblaste qui n'est pourtant pas capable de ce différencier de façon autonome. En effet, si l'action inductrice est interrompue à ce

moment, sa différenciation préneurale ou bien avorte complètement ou bien se traduit par la formation exclusive de la crête neurale.

*Summary.* Two grafts of Hensen's node were implanted on the same host blastoderm the first graft in the area pellucida, the second in the area opaca. At various intervals, the grafts were detached from the ectoblast and host blastoderms were allowed to grow in order to assess the type of inductive response produced by the ectoblast. These experiments show that 2–6 h were necessary to elicit neural induction in the ectoblast of the area pellucida, while 7–9 h were required to obtain neural induction in the area opaca.

J. GALLERA

*Laboratoire d'Embryologie expérimentale,  
Institut d'Histologie de l'Université,  
CH-1211 Genève (Suisse), 25 mai 1970.*

## Effect of Thymectomy on the Differentiation and Phagocytic Activity of the Liver Sinusoidal Cells

Different effects of thymectomy on the reticuloendothelial system have been reported in recent years. According to OSOBA and MILLER<sup>1</sup> and MILLER and HOWARD<sup>2</sup>, thymectomized mice often show an increase in size and number of the Kupffer cells, accounting for the marked increase in phagocytic activity as measured by the clearance from the blood of colloidal carbon. However, a significant reduction in radiogold clearance was found in the thymectomized mice by FRIDRICH and SCHÄFER<sup>3</sup>. A similar reduction, although not statistically significant, was shown by FUMAROLA et al.<sup>4</sup> in rats after thymectomy. Little difference in the clearance of colloidal carbon was observed by MORROW and DI LUZIO<sup>5</sup>: the rate of removal from the blood after an injection of 8 mg/100 g body weight was about the same in thymectomized and in sham-operated rats. Experiments with rats by CORSI et al.<sup>6,7</sup> showed that after a single injection of 16 mg carbon/100 g body weight the rate of removal is significantly reduced after thymectomy: after repeated injections the granulogetic index was appreciably increased. Under the latter conditions a much larger storage in the spleen was observed in comparison with normal animals<sup>7,8</sup>. The increased phagocytic activity of the spleen could not account for the increased granulogetic index, because the largest amount of the injected carbon was stored in the liver, both in normal and thymectomized animals<sup>8</sup>. On the other hand, no change in the hepatic endothelial cells was observed in non-injected thymectomized rats by WAKSMAN et al.<sup>9</sup> and by CORSI et al.<sup>7</sup>.

A morphological study of the endothelial cells in the rat liver after i.v. injections of trypan blue is reported here.

Wistar albino rats were thymectomized 2 days after birth. At 5–6 weeks of age the animals were injected i.v. with 0.9% trypan blue in saline, 2 ml/100 g body weight, and were killed 1 h later. In a number of cases the same dose of dye was repeated with a 1 h interval: the animals were killed 1 h after the second injection. Normal rats of the same age and body weight were used as controls. The liver was fixed in the Susa solution, embedded in paraffin and stained with haematoxylin and eosin. The cells of the hepatic sinusoids were studied with a view to evaluate the percentage of the cells showing a swollen

cytoplasm and a large and pale nucleus, i.e. the peculiarities of the Kupffer cells. When the characters were not typical, density of the nucleus, rather than the size and shape of the cell, was used as a criterion for classification: cells with a pale nucleus were classified as Kupffer cells. An evaluation was made also of the percentage of sinusoidal cells containing the injected dye. The counts were made in both principal lobes, on 400 cells in each animal. The results are summarized in Tables I and II.

No significant difference was observed between normal and thymectomized animals after 1 injection of the dye. The number of Kupffer cells was about the same as in normal and thymectomized rats which received no injection. A marked increase in the number both of Kupffer cells and of vitally stained cells was observed in the thymectomized rats after 2 injections of trypan blue. It is worth noting that transitional appearances between the typical endothelial cells and the typical Kupffer cells were frequent in all livers. The dye could be detected in most Kupffer cells and occasionally also in typical endothelial cells.

The present results seem to favour the view that the endothelium-like cell of the liver sinusoids may transform under circumstances into a Kupffer cell<sup>10,11</sup>. Differentiation into Kupffer cells is not increased by thymectomy

- 1 D. OSOBA and J. F. A. P. MILLER, *J. exp. Med.* **119**, 177 (1964).
- 2 J. F. A. P. MILLER and J. G. HOWARD, *J. Reticuloendothelial Soc.* **1**, 369 (1964).
- 3 R. FRIDRICH and M. SCHÄFER, *Experientia* **22**, 552 (1966).
- 4 D. FUMAROLA, L. MARCUCCIO and S. SALAMANNA, *Haematologica* **53**, 481 (1968).
- 5 S. H. MORROW and N. R. DI LUZIO, *Nature, Lond.* **205**, 193 (1965).
- 6 A. CORSI and G. V. GIUSTI, *Nature, Lond.* **213**, 618 (1967).
- 7 A. CORSI, G. V. GIUSTI, A. L. GRANATA and L. RODIGHIERO, *Sperimentale* **118**, 19 (1968).
- 8 G. V. GIUSTI and A. CORSI, *Nature, Lond.* **214**, 916 (1967).
- 9 B. H. WAKSMAN, B. G. ARNASON and B. D. JANKOVIC, *J. exp. Med.* **116**, 187 (1962).
- 10 E. LETTERER, *Allgemeine Pathologie* (Thieme, Stuttgart 1959).
- 11 W. BLOOM and D. W. FAWCETT, *A Textbook of Histology* (Saunders, London 1968).