

testis fluid is able to contaminate the tubular protein pattern due to reflux, as suggested recently by Tuck et al.¹⁴ on the basis of ionic concentrations of the fluids, will need further experimentation.

Zusammenfassung: Die Flüssigkeit in den Hodenkanälchen enthielt mehrere Proteine, die im Serum oder in der Hodenlymphe nicht nachweislich waren. Nur von einigen der Serumproteine waren in der Flüssigkeit der Hodenkanälchen schwache elektrophoretische Bänder zu sehen.

M. KORMANO¹⁵, A. I. KOSKIMIES¹⁵ and R. L. HUNTER¹⁶

Department of Anatomy, University of Helsinki, Siltavuorenpenger 20, Helsinki 17 (Finland); and Department of Human Anatomy, School of Medicine, University of California, Davis (California 95616, USA), 28 Mai 1971.

¹⁴ R. R. TUCK, B. P. SETCHELL, G. M. H. WAITES and J. A. YOUNG, Pflügers Arch. ges. Physiol. 318, 225 (1970).

¹⁵ Supported by a grant from the National Research Council for Medical Sciences, Helsinki, Finland.

¹⁶ On sabbatical leave from the Department of Human Anatomy, School of Medicine, University of California, Davis (California 95616, USA).

La localisation extra-embryonnaire des cellules germinales chez l'embryon de Lézard vivipare (*Lacerta vivipara* Jacquin)

Des recherches descriptives ont conduit à situer les gonocytes du Lézard vivipare dans un croissant extra-embryonnaire postérieur qui embrasse directement l'extrémité caudale de l'embryon¹⁻³. Cette localisation a été en partie confirmée expérimentalement⁴ par ablation chirurgicale du croissant extra-embryonnaire, supposé contenir les gonocytes, chez des embryons de 6 paires de somites (stade 19 de la table de développement de ce Lézard⁵). Le nombre de gonocytes contenu dans les crêtes génitales des embryons opérés était significativement inférieur à celui des témoins mais il restait en moyenne de l'ordre de 20. Ce résultat pouvait tenir au fait que des gonocytes avaient déjà pénétré dans les tissus embryonnaires au moment de l'intervention chirurgicale. Nous avons donc renouvelé l'expérience d'une part à des stades de développement plus précoces pour vérifier cette interprétation, d'autre part à un stade plus âgé pour préciser à quelle période les cellules germinales ont envahi l'embryon.

Matériel et méthodes. Les femelles gestantes ont été sacrifiées par décapitation dans les 2 à 3 jours suivant la capture. Immédiatement après le sacrifice, les utérus sont disséqués et placés dans du liquide physiologique de Tyrode stérile. Les oeufs sont extraits des utérus et mis en attente dans un nouveau bain de Tyrode stérile. Chaque oeuf est ensuite déposé dans une coupelle dont le fond de paraffine est creusé d'une petite loge; cette coupelle est remplie de Tyrode. L'oeuf, débarrassé de ses membranes coquillière et vitelline à l'aide de pinces fines est immobilisé dans la petite loge, l'embryon face à l'opérateur. Le territoire extra-embryonnaire supposé contenir les gonocytes, d'après l'étude histologique d'embryons normaux (Figures 1 et 2), est découpé à l'aide de ciseaux Pascheff-Wolff et extirpé avec des pinces fines. Le vitellus de l'oeuf est assez consistant pour ne pas s'écouler en l'absence des membranes et l'embryon est donc laissé en place sur son

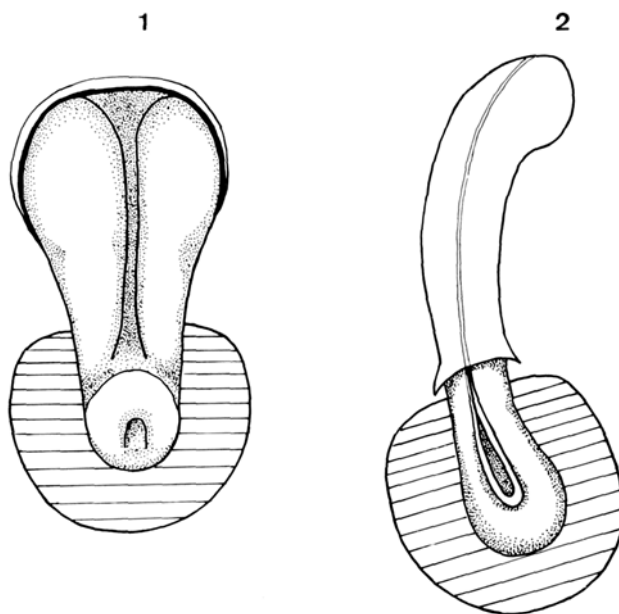


Fig. 1. Représentation schématique d'un embryon au stade 15.

Fig. 2. Représentation schématique d'un embryon au stade 20. Pour les figures 1 et 2 la zone extra-embryonnaire supprimée est indiquée en hachures.

¹ J. P. DUFAURE et J. HUBERT, C. r. Acad. Sci., Paris, Série D, 261, 237 (1965).

² J. HUBERT, Ann. Embr. Morph. 2, 479 (1969).

³ J. HUBERT, Archs Anat. microsc. Morph. exp. 59, 253 (1970).

⁴ J. HUBERT, C. r. Acad. Sci. Série D, 261, 4505 (1965).

⁵ J. P. DUFAURE et J. HUBERT, Archs Anat. microsc. Morph. exp. 50, 309 (1961).

	Opérés		Témoins	
Stade de mise en culture	15 et 17	20	15 et 17	20
Nombre d'embryons cultivés	13	11	9	7
Nombre d'embryons fixés au stade 30-31	7	8	7	6
Nombre moyen de gonocytes au stade 30-31	11	97	82	101

propre vitellus. L'œuf est transporté sur une spatule dans une coupelle contenant un peu d'albumine d'œuf de Poule selon la technique de DUFAYRE⁶. La coupelle est fermée hermétiquement et placée dans une étuve à 27°C. Des embryons témoins, provenant de la même femelle que les embryons opérés, sont cultivés de façon identique.

Lorsque les embryons mis en incubation ont atteint le stade désiré, ils sont fixés dans le liquide de Bouin Hollande et inclus dans la paraffine. Les pièces sont débitées en coupes sérieées de 7 µm d'épaisseur. Les préparations histologiques sont colorées à l'hémalum-éosine ou à l'azocarmine G-vert lumière. Les gonocytes, reconnus à certains aspects cytologiques⁷, sont dénombrés au niveau des crêtes génitales en prenant soin de vérifier pour chaque embryon que des gonocytes ne sont pas situés dans d'autres régions.

Résultats. 1. Ablation du croissant extra-embryonnaire supposé contenir les gonocytes aux stades 15 et 17. Précisons que le stade 15 correspond à de jeunes neurula (Figure 1), le stade 17 à des neurula âgées. Au total, pour ces deux stades, 13 embryons ont été opérés; 7 se sont développés et ont été fixés aux stades 30 ou 31, stades auxquels les gonocytes ont normalement colonisé les crêtes génitales. Les résultats obtenus étant comparables pour les stades 15 et 17 nous les avons groupés. Dans les meilleurs cas, soit 4 embryons sur 7, 4 à 6 gonocytes seulement sont dénombrés dans les crêtes génitales ou à proximité. Chez les 3 autres embryons le nombre de cellules germinales est de 15, 16 et 26. Le nombre moyen de gonocytes est de 11 pour les «opérés» et de 82 chez les témoins (Tableau). Il convient de signaler que le développement des crêtes génitales des embryons opérés est tout à fait normal.

2. Ablation du même croissant extra-embryonnaire au stade 20 (Figure 2). Nous avons opérés 11 embryons; 8 se sont développés et ont été fixés au stade 30. Ces embryons possèdent un nombre de gonocytes comparable à celui des témoins. Ce résultat confirme celui que nous avons obtenu précédemment⁴. A ce stade les gonocytes ont envahi les tissus embryonnaires.

Discussion, Conclusion. Bien que nous n'ayons pas réussi à stériliser les embryons, le nombre réduit de gonocytes dans les crêtes génitales des embryons opérés nous semble suffisant pour démontrer la localisation extra-embryonnaire postérieure de ces cellules. D'autre part, ce résultat confirme, s'il en est encore besoin, l'origine extra-embryonnaire des cellules germinales chez les Amniotes. On peut se demander néanmoins pourquoi les embryons opérés possèdent encore un certain nombre de gonocytes.

La localisation de gonocytes dans l'aire extra-embryonnaire antérieure ne nous paraît pas devoir être retenue car nous n'avons jamais repéré histologiquement de gonocytes dans cette zone. Par contre, il est probable que des cellules germinales échappent à l'intervention chirurgicale, notamment celles situées très près de l'embryon^{2,3}.

Par ailleurs, la présence de quelques gonocytes dans les crêtes génitales d'embryons opérés permet de faire une remarque: si les gonocytes qui subsistent après l'intervention se divisent ils le font du moins à un rythme très lent; en effet, dans le cas contraire des embryons opérés au stade 15 atteignant le stade 30 au bout de 7 à 8 jours à 27°C, possèderaient plus de 4 gonocytes. Nous rappelons à ce propos que nous n'avons jamais observé de gonocytes en division chez le Léopard vivipare² au cours de la phase de migration ou au niveau des jeunes crêtes génitales. Il semble donc que l'inertie mitotique soit une caractéristique physiologique des gonocytes du Léopard vivipare durant une assez longue période du développement embryonnaire. Nous signalons que les résultats préliminaires de recherches autoradiographiques en cours vont dans ce sens⁸.

En conclusion ces résultats expérimentaux sont en accord avec les données histologiques¹⁻³. Les gonocytes sont localisés dans un croissant extra-embryonnaire postérieur à proximité de l'embryon avant de pénétrer dans les tissus embryonnaires.

Summary. The surgical ablation of an extra-embryonic posterior crescent that directly encloses the caudal end of young embryos, reduces to a few gonocytes the germinal stock in the genital ridges. The same operation performed upon embryos of 10 somites is without any action. The presence of some gonocytes in the genital ridges of the operated embryos is discussed.

J. HUBERT

avec la collaboration technique de Madame M. HUBERT

Laboratoire de Biologie Animale,
Université de Clermont, B.P. 45, 63 Aubière (France),
24 mai 1971.

⁶ J. P. DUFAYRE, *Archs Anat. microsc. Morph. exp.* 55, 439 (1966).

⁷ J. HUBERT, *Z. Zellforsch.* 107, 249 (1970).

⁸ J. HUBERT et CL. ANDRIVON, en préparation (1971).

Melanin Granule Shape in Tissue-Cultured Embryonic Pigment Cells

When chick retinal pigment (tapetal) cells are grown in monolayer culture in medium containing embryo extract they dedifferentiate their melanotic phenotype¹. The cells lose the ability to maintain an effective level of melanin synthesis, and the melanin already present, which occurs in an organized granule (called a melanosome), is diluted by cell growth and division². During subsequent organ culture of these dedifferentiated cells in the same medium¹ or when dedifferentiated cells are dispersed in medium containing a low-molecular-weight fraction of embryo extract³, at least some of the previously differentiated cells become pigmented once again. Melanin in the tapetal cells of Rhode Island Red and White Leghorn chick embryos occurs in discrete rod-shaped granules (Figure 1). The pigment granules of the second-

arily pigmented cells from each of these breeds have been reported to be tiny spheres rather than the original rod shape^{3,4}. This finding raises an important question about the stability of determination in the dedifferentiated pigment cells: have the dedifferentiated cells actually lost the ability to produce granules of the original size and shape?

¹ J. R. WHITTAKER, *Devel. Biol.* 8, 99 (1963).

² J. R. WHITTAKER, *Devel. Biol.* 15, 553 (1967); J. R. WHITTAKER, *J. exp. Zool.* 169, 143 (1968).

³ R. D. CAHN and M. B. CAHN, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 55, 106 (1966).

⁴ J. R. WHITTAKER, in *Results and Problems in Differentiation* (Ed. H. URSprung; Springer-Verlag, New York 1968), vol. 1, p. 25.