

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.

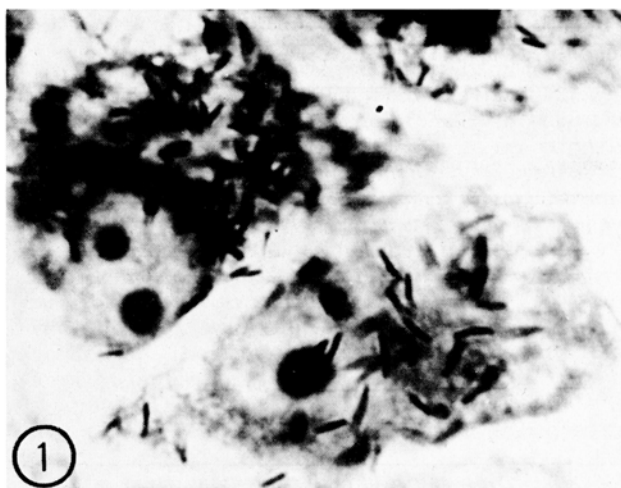


Fig. 1. 7-day chick tapetal cells after 60 h in primary culture. Monolayer coverslip preparation stained in May-Grünwald and Giemsa stains. $\times 2100$.

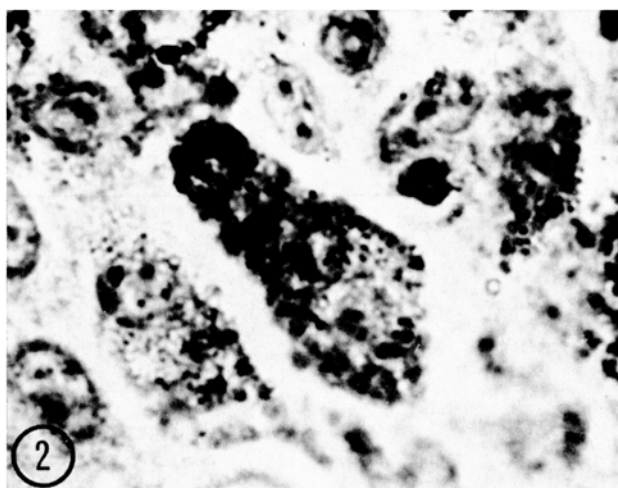


Fig. 2. 7-day chick tapetal cells grown for 43 days in monolayer culture and transferred to organ culture for 5 days as an aggregated mass. 7- μ m section stained in hematoxylin-eosin. $\times 2100$.

When retinal pigment cells of 6½- to 7-day Rhode Island Red chick embryos (HAMBURGER and HAMILTON⁵ stages 30,31) were grown for 30 days or longer in frequently subdivided monolayer cultures and then reaggregated into tissue masses and maintained as organ cultures, the granules which appeared in the cells after 4-5 days of organ culture were tiny spherical particles (Figure 2). Even in cells observed after 2 weeks in organ culture, none of the granules were rod-shaped. Similar results were obtained when White Leghorn embryos were used. The culture methods have been described previously^{1,2}.

The purpose of this communication is to suggest that the granule shape observed in these cultured cells is not caused by a change in the capabilities of the dedifferentiated cells, but by a response of the cells to the culture environment. This hypothesis is substantiated by the behavior of normal chick tapetal cells in organ culture. Tissues from 3- to 3½-day Rhode Island Red embryos (stages 18 and 19) were maintained as organ cultures on Millipore filter rafts in a medium consisting of 1 part Tyrode's saline solution, 2 parts horse serum, and 1 part 12-day chick embryo extract (with 50 IU/ml each of potassium penicillin G and streptomycin sulfate, and 0.005% phenol red). 7 series of these cultures were sectioned and studied histologically after times in culture ranging from 1 to 19 days. The tapetum was unpigmented at the time the cultures were initiated, but became visibly pigmented after 1 to 2 days in organ culture. Spherical pigment granules similar in size to those of the secondarily pigmented cells of Figure 2 were produced in culture.

If spherical granules develop in normal chick retinal pigment cells after a relatively short time in organ culture, there is no reason to believe that the extensive growth (cell division) and dedifferentiation occurring in mono-

layer cultures necessarily cause any restriction in the potential range of melanosome differentiation. There is no significant amount of cell division in organ cultures of the young pigment epithelium pieces.

The formation of chick pigment cell melanosomes has been investigated at the ultrastructural level⁶, but nothing is yet known about how extracellular conditions can affect granule size or shape. However, the genotype of the pigment cell appears to influence its response to the culture environment. Under organ culture conditions comparable to those used above, melanocytes developing in neural crest explants of certain chicken breeds have rod-shaped granules, whereas White Leghorn melanocytes develop spherical granules under the same conditions⁷. Possibly culture conditions will eventually be found which will permit completely normal granule development⁸.

Zusammenfassung. In Kurzzeitkulturen mit noch intakten embryonalen Retina-Pigmentzellen von Hühnchen sowohl als auch in Langzeitkulturen, in denen die entdifferenzierten Zellen wieder zur Pigmentbildung angeregt wurden, sind die Pigmentgranula kugelförmig im Gegensatz zu den stäbchenförmigen in vivo.

J. R. WHITTAKER

*The Wistar Institute of Anatomy and Biology,
36th Street at Spruce,
Philadelphia (Pennsylvania 19104, USA), 4 June 1971.*

⁵ V. HAMBURGER and H. L. HAMILTON, *J. Morph.* 88, 49 (1951).

⁶ J. A. BRUMBAUGH, *Develop. Biol.* 18, 375 (1968); P. STANKA, *Z. Zellforsch.* 112, 120 (1971).

⁷ H. L. HAMILTON, *Anat. Rec.* 78, 525 (1940).

⁸ Research supported by NSF Grant No. GB-15960 and by USPHS Grants Nos. CA-10815 and RR-05540.

Tumour-Promoting Activity of Fatty Acid Methyl Esters in Mice

In our previous studies on carcinogenic properties of lipids, a preliminary screening was made by the newt test. The most potent inducer of epithelial hyperplasia was methyl 12-oxo-trans-10-octadecenoate¹. Methyl hy-

droxyoctadecadienoate was also highly active. The 2 compounds have now been tested for carcinogenic and tumour-promoting activity on mouse skin. Methyl oleate which was inactive in the newt was also tested.