

### Analyse expérimentale de l'expression de la mutation léthale récessive «léthal mitotique», chez *Pleurodeles waltl* (Amphibien Urodèle)

La mutation «léthal-mitotique» (*lm*), mutation léthale récessive du Pleurodèle identifiée par GALLIEN et COLLENOT<sup>1</sup>, se manifeste au moment de l'éclosion et avant la première prise de nourriture par un arrêt de la croissance générale et de la différenciation du membre antérieur qui reste à l'état de bourgeon conique. En outre, les embryons léthaux (*lm/lm*) présentent une tête étroite, de la microptalmie et les ramifications secondaires de leurs branchies sont réduites. L'analyse cytologique révèle dans tous les tissus un aspect inhabituel; on observe un grand nombre de cellules en métaphase comme si les divisions cellulaires demeuraient bloquées à ce stade. Les chromosomes apparaissent cependant fissurés mais ils ont une disposition anarchique. Dans le but de rechercher si la mutation «léthal mitotique» s'exprime de façon autonome ou non, nous avons réalisé des expériences du type de celles effectuées chez l'Axolotl par HUMPHREY<sup>2,3</sup>, au cours de l'étude de plusieurs mutations.

*Méthode expérimentale.* 2 types d'opérations ont été réalisés sur des embryons aux stades du bourgeon caudal (stades 22 à 24 de la table chronologique<sup>4</sup>): d'une part des associations en parabiose, d'autre part, des greffes hétérotopiques d'ébauches d'organes (œil, membre antérieur et queue). Ces interventions de microchirurgie embryonnaire ont été réalisées dans la solution physiologique de STEINBERG<sup>5</sup>. Chaque série d'associations en parabiose a été mise en œuvre sur des embryons appartenant à une même ponte issue de parents hétérozygotes, de telle sorte que sur l'ensemble des opérations réalisées

6/16 d'entre elles représentent des associations entre un embryon normal et un embryon léthal. Les greffes hétérotopiques d'ébauches d'organes ont été effectuées sur le flanc, les embryons donneurs provenaient de pontes issues de parents hétérozygotes, les embryons receveurs appartenaien à des pontes standard. Les embryons donneurs ont été maintenus en élevage jusqu'au moment de la prise de nourriture de manière à reconnaître ceux qui étaient léthaux. C'est à partir de ce stade que l'évolution des combinaisons opératoires «léthal-normal» a été régulièrement observée et comparée à celle de combinaisons «normal-normal». Les données numériques concernant l'ensemble des opérations réalisées et les combinaisons «léthal-normal» sont rassemblées dans le Tableau.

Les fixations ont été effectuées à différents stades de la vie larvaire à l'aide du liquide fixateur de Halmi; pour quelques associations en parabiose l'élevage a été poursuivi jusqu'au stade de la métamorphose. L'étude histologique a été réalisée après inclusion dans la paraffine et coloration des coupes par le rouge nucléaire solide et le picro-indigocarmine.

<sup>1</sup> L. GALLIEN et A. COLLENOT, C. r. Acad. Sci., Paris 259, 4847 (1964).

<sup>2</sup> R. R. HUMPHREY, Devl. Biol. 4, 423 (1962).

<sup>3</sup> R. R. HUMPHREY, J. exp. Zool. 155, 139 (1964).

<sup>4</sup> L. GALLIEN et M. DUROCHER, Bull. biol. Fr. Belg. 91, 94 (1957).

<sup>5</sup> M. STEINBERG, Carnegie Inst. Washington Year Book 56, 347 (1957), cité par J. D. EBERT.

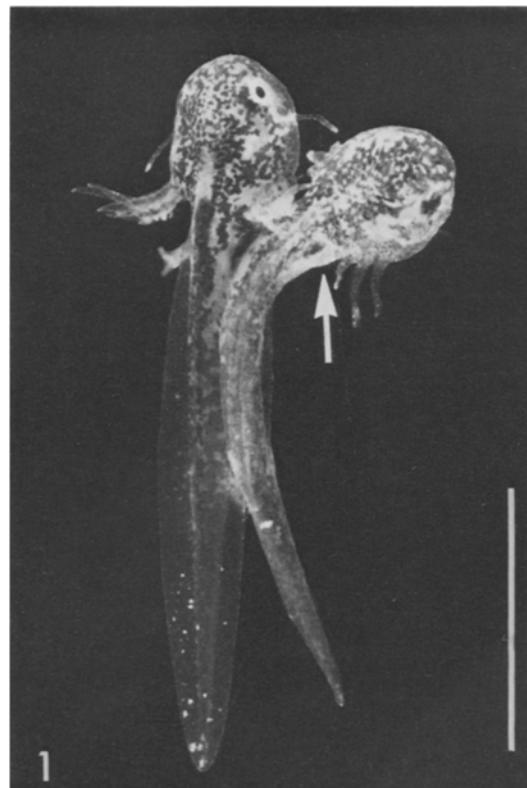


Fig. 1. Association en parabiose «normal-léthal» au stade 39, 8 jours environ après l'expression de la mutation; le bourgeon du membre antérieur droit de l'individu léthal est à peine visible (flèche).

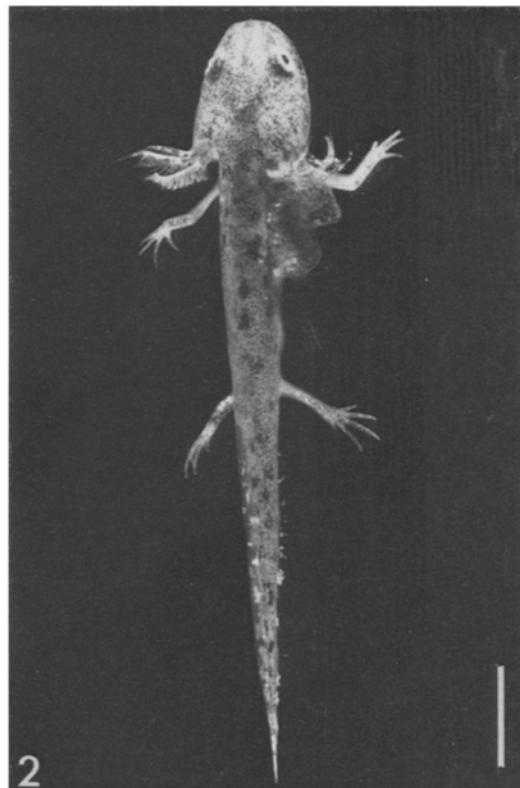


Fig. 2. Même parabiose que celle représentée sur la Figure 1 après 2 mois d'élevage (stade 54); la régression de l'individu léthal est très prononcée. Les traits d'échelle des Figures 1 et 2 représentent 5 mm.

	Nombre d'opérations réalisées	Nombre de combinaisons léthal-normal obtenues et pourcentage correspondant
Associations en parabiose	176	59 (33,5%)
Greffes d'ébauches		
Oeil	29	6 (20,6%)
Membre antérieur	30	6 (20%)
Queue	34	8 (23,5%)

**Résultats.** 1. *Parabioses.* L'association en parabiose ne modifie pas les caractères ni le moment de l'expression de la mutation «léthal-mitotique». Associés ou non en parabiose, les individus *lm/lm* ont le même aspect au stade de la prise de nourriture (stades 37, 38) mais leur évolution est différente: alors que les embryons léthaux libres meurent dans un délai de quelques jours à la suite d'une cytolysé généralisée, associés en parabiose avec des individus normaux, ils vont subir une régression lente sans aucune plage de nécrose apparente. La régression est progressive, elle est peu perceptible pendant les 15 premiers jours puis elle s'accentue régulièrement et elle est presque totale lorsque l'animal normal atteint le stade de la métamorphose; les yeux et les branchies sont les premiers à disparaître, la région céphalique et la queue s'estompent plus lentement (Figures 1 et 2).

L'étude histologique des associations en parabiose montre d'une manière très nette, au moment où s'exprime la mutation, la juxtaposition des embryons normaux et léthaux (Figures 3 et 4). Chez ces derniers on observe, comme chez les embryons léthaux libres, des cellules bloquées en métaphase et, quoique en moins grand nombre, des cellules dont les noyaux sont pycnotiques. Cependant, aucune trace de cytolysé ni de désagrégation profonde ou superficielle n'est visible. En outre, les cartilages céphaliques, la chorde et les muscles ont un aspect presque normal. L'évolution des parabioses est caractérisée par la raréfaction des noyaux pycnotiques et des cellules bloquées en métaphase et par une désorganisation progressive de l'embryon léthal qui aboutit au rassemblement des divers tissus en un amas compact dans lequel la chorde et les cellules cartilagineuses persistent

longtemps. Les embryons normaux des associations ont toujours présenté une structure et une organisation normales.

2. *Greffes hétérotopiques.* Qu'elles soient en place sur les embryons léthaux ou greffées sur des embryons normaux, les ébauches d'œil et de membre antérieur atteignent le même degré d'organisation. Ensuite, la régression de ces ébauches greffées est précoce et rapide. 15 jours après l'expression de la mutation chez les embryons donneurs, elles ont involué et elles ne sont pratiquement plus décelables à la simple observation; cependant, il persiste parfois à l'emplacement de l'ébauche oculaire un amas de mélanophores. L'ébauche de la queue a un développement normal; ultérieurement elle régresse, mais plus lentement que les 2 précédentes ébauches et elle a disparu au moment de la métamorphose de l'embryon receveur. Des plages hémorragiques sont visibles au voisinage immédiat des greffons, elles ont en général un caractère transitoire.

L'étude histologique permet de constater que l'ébauche oculaire, après 3 semaines d'élevage de l'embryon porteur, est réduite à un amas de cellules rétiniennes entouré d'une couche de mélanophores. L'ébauche du membre antérieur présente une évolution comparable, elle est réduite à un petit nombre de cellules indifférenciées, entourées de mélanophores. Parfois, une partie du pronéphros a été fortuitement greffée en même temps que l'ébauche du membre antérieur. Ce pronéphros est repérable ultérieurement sous la forme d'un ou deux tubules d'aspect normal. Au niveau de l'ébauche de queue on peut constater la désorganisation progressive des tissus parmi lesquels la chorde est remarquablement stable. Dans l'ensemble des ébauches greffées le nombre des cellules à noyau

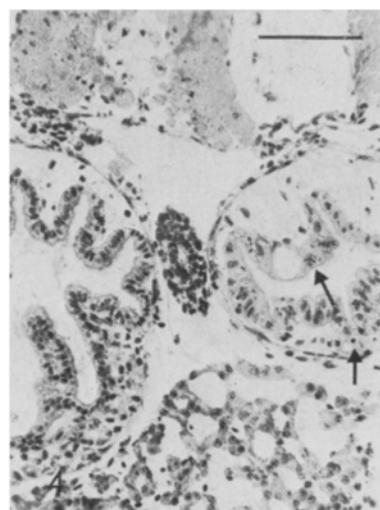


Fig. 3. Coupe histologique d'une parabiose «normal-léthal» au stade 39 (l'individu léthal est à droite). Fig. 4. Partie agrandie de la Figure 3; les cellules en métaphase et les cellules à noyau pycnotique (flèches) sont abondantes au niveau de l'intestin de l'individu léthal. Les traits d'échelle des Figures 3 et 4 représentent 100  $\mu$ m.

pycnotique et des cellules bloquées en métaphase est moins important que chez les individus léthaux dans les tissus correspondants. Au voisinage des ébauches en régression, on observe parfois de nombreux polynucléaires sans toutefois constater de plages de nécrose étendues.

*Discussion et conclusions.* L'association en parabiose permet la survie, le développement et l'étude ultérieure d'embryons léthaux<sup>6</sup>. Cette technique a été utilisée chez l'Axolotl par HUMPHREY<sup>2,3</sup> pour tenter d'assurer la viabilité d'embryons porteurs de mutations léthales. Cet auteur a pu ainsi montrer que l'expression de la mutation «v» (caractérisée par une vasodilatation générale) est totalement masquée grâce à l'association en parabiose alors que celle de la mutation «r» (caractérisée par un ralentissement de la croissance générale et par des lésions du pronéphros) n'est pas modifiée (plusieurs mois après l'opération, les organes de l'individu léthal sont en cours de dégénérescence). Les résultats que nous présentons montrent qu'il en va de même pour la mutation «léthal-mitotique». L'expression de la mutation dans les associations est la même que chez les individus léthaux libres et la régression progressive des tissus léthaux est achevée au moment où l'autobionte normal se métamorphose. La situation est comparable en ce qui concerne les greffes d'ébauches d'organes.

Nos expériences montrent que la mutation «léthal-mitotique» s'exprime d'une manière autonome au niveau des organes greffés ou des parabiontes. Cependant, l'association avec des embryons sains permet la survie de

certains tissus pendant plusieurs mois. Ceci est à opposer aux travaux réalisés chez le Pleurodèle sur la mutation «ascite caudale»<sup>7</sup> qui ont montré que non seulement l'association en parabiose ne guérit pas l'embryon léthal mais encore qu'elle conduit à la mort précoce du couple formé.

Le caractère cellulaire autonome de l'expression de la mutation «léthal-mitotique» et la présence dans tous les tissus léthaux de nombreuses cellules bloquées en métaphase nous ont conduit à rechercher une anomalie éventuelle de l'appareil mitotique (J. Microsc., à paraître)<sup>8</sup>.

*Summary.* The autonomous cellular expression of a recessive lethal mutation, *lm* ('léthal-mitotique'), isolated in the Salamander *Pleurodeles waltlii* Michah. is demonstrated by the way of parabiotic associations and heterotopic grafts.

P. GOUNON et A. COLLENOT

*Laboratoire de Biologie animale 7 PCEM,  
Université Paris VI, 4, Place Jussieu,  
F-75230 Paris-Cedex 05 (France), et Centre de  
Recherches d'Ivry du CNRS (France), le 21 mars 1974.*

<sup>6</sup> L. GALLIEN, C. r. Soc. Biol., Paris 151, 1085 (1957).

<sup>7</sup> A. JAYLET, J. C. BEETSCHEN et P. DEPARIS, C. r. Acad. Sci., Paris 271, 233 (1970).

<sup>8</sup> P. GOUNON et A. COLLENOT, J. Microsc. 20, 2, (1974).

## Comparison of the Effects of Lithium, $\beta$ -Phenylethylamine and Tyrosine on *Xenopus* Embryos

Lithium ions have been shown to have morphological effects on a variety of developing systems<sup>1</sup>. Lithium influences the morphology of sponges<sup>2</sup> and alters the pattern of tentacle regeneration in hydra<sup>3</sup>. In sea urchin embryos, lithium treatment produces vegetalization and exogastrulation: that is, over-development of endoderm. Since lithium produces similar effects in the amphibian embryo<sup>4</sup>, it is possible that it alters control factors common to embryos of different species.

The elucidation of the mechanisms by which an agent effects the balance of early development in a specific and repeatable way might give some indication of the mechanisms which control this balance in normal development. However, although many biochemical differences between normal and lithium-treated embryos have been described<sup>5</sup>, the nature of the action of lithium on amphibian and sea-urchin embryos is unknown.

Lithium has been used in the treatment of certain mental diseases, and research in this field suggests that lithium acts via biologically active amines<sup>6</sup>. This led LALLIER<sup>7</sup> to compare the effects of amines and amino acids on the early development of the sea urchin, *Paracentrotus lividus*, with those of lithium. He found that embryos exposed to  $10^{-3} M$  tyrosine for 20 h were weakly vegetalized (less than 20% of embryos vegetalized). Under identical conditions,  $2.5 \times 10^{-4} M$   $\beta$ -phenylethylamine had a strong vegetalizing effect (100% of embryos vegetalized). These and similar results led Lallier to suggest that lithium might be acting via amines in the sea urchin embryo. Since lithium produces similar morphological effects in amphibian embryos, it is of interest to establish if these chemicals can produce vegetalizations in this system too. In this paper the effects of lithium chloride,  $\beta$ -phenylethylamine and tyrosine on amphibian embryos are described.

*Materials and methods.* Embryos of *Xenopus laevis* were obtained by injecting adults with chorionic gonadotrophin (Pregnyl, Wellcome), and the jelly was removed chemically by the method of DAWID<sup>8</sup>. Embryos were cultured in 10% Holtfreter saline, pH 7.3, at room temperature (21°C) and staged according to NIEUWKOOP and FABER<sup>9</sup>. Embryos of either early cleavage (stage 2-4), mid-cleavage (stage 8-9), blastula (stage 8-9) or late blastula (stage 9-9½) stages were used. They were exposed to lithium chloride, tyrosine or  $\beta$ -phenylethylamine (Sigma) for 3 h, washed in 2 changes of 100 ml of 10% Holtfreter saline, and allowed to develop in 10% Holtfreter saline. Some embryos were cultured continuously in the teratogens. Results were scored when the control embryos had reached the neurula stage (stage 17-19), and apply to embryos exposed for 3 h unless otherwise stated.

*Results and discussion.* A range of abnormalities was found in these experiments. They were classified into 3 main types: exogastrulae without neural structures; embryos in which the neural folds were separated by protruding yolk cells; and neurulae in which the ventral

<sup>1</sup> M. SCHOU, Pharmac. Rev. 9, 17 (1957).

<sup>2</sup> H. V. BRØNSTED, Acta zool., Stockh. 17, 75 (1936).

<sup>3</sup> R. E. EAKIN, in *The Biology of Hydra* (Ed. H. M. LENHOFF and W. F. LOOMIS; University of Miami Press 1961), p. 399.

<sup>4</sup> S. BÄCKSTRÖM, Ark. Zool. 6, 527 (1954).

<sup>5</sup> J. NEEDHAM, *Biochemistry and Morphogenesis* (Cambridge University Press, Cambridge 1942).

<sup>6</sup> M. SCHOU, Biochem. Soc. Transact. 1, 81 (1973).

<sup>7</sup> R. LALLIER, C. r. Acad. Sci., Paris, Série D 276, 3473 (1973).

<sup>8</sup> I. B. DAWID, J. molec. Biol. 12, 581 (1965).

<sup>9</sup> P. D. NIEUWKOOP and J. FABER, *A Normal Table of Xenopus laevis Daudin* (North-Holland Publishers, Amsterdam 1956).