

buds were quite normal 14, 28 and 42 days after section. Electron microscopy revealed a consecutive disappearance of type II junctions (with postsynaptical cisternae), assigned to efferent innervation⁶.

3. Freezing of the Vth and VIIth cranial ganglia. Cryonecrosis was performed by consecutively repeated applications of an ophthalmological cryode, frozen by liquid nitrogen (-180°C , 3-8 times, 30 sec each). As was pointed out on rat sciatic nerve, local freezing of axon blocked conduction for 10 days but maintained untouched the basal lamina during degenerative phase, thus allowing a perfect reinnervation^{7,8}.

In the present experiment, such a restauration of efferent innervation, passing along the ganglia, was expected. The bodies of the sensory neurons underwent chromatolysis, but were still present 50 days after freezing. The buds were normal at 14 and 28 days. After 50 days, numerous buds were spherical and had no more taste pore, others were elongated, some of these being oblique or parallel to the surface of the epithelium, or even aiming towards the basal lamina.

4. Freezing of the Vth and VIIth ganglia plus section of the nerve roots. After this double intervention, the buds seemed quite normal for 28 days. As with single freezing, all buds were spherical or parallel to the surface after 50 days (figure 1). Basal cells were present. Some buds did not possess any dermal papilla. Examination with electron microscope revealed large areas of the buds where holes pointed out the site of disappeared sensory cells between the sustentacular cells. These holes, ultimately filled with light extracellular material, might confine cellular remnants and leucocytes involved in phagocytosis. The form of the sustentacular cells was well maintained, whereas the cytoplasmic feature was poorly preserved: vesicles and cister-

nae became rarefied, whilst mitochondriae and fibrillae remained (figure 2). However, some sectors of the buds seemed quite normal: the sensory cells even showed a dense, highly osmophilic, perinuclear formation, located between endoplasmic reticulum profiles. This formation, not yet described, is well developed in springtime and normally undergoes seasonal changes. The difference in degenerative response may proceed by partial denervation, some neurons having escaped from freeze injury. Such a quantitative action of a partial denervation has already been shown on rat taste buds⁹. Besides, chromatolyzed neurons may possess, a trophic influence, as in the rat¹⁰.

Conclusions. The persistence of the taste-buds after denervation continues longer than previously thought. The form of the bud is preserved for a time by the sustentacular cells, after gustatory cells degeneration. The longer persistence of sustentacular cells after the freezing experiments suggests a trophic influence by chromatolyzed neurons. The disappearance of most gustatory cells and the loss of polarity of the buds after freezing of the ganglia reveal a dysjunction of 2 factors of nervous origin, active on the 2 cellular types, or at least a differential sensitivity to a diminished flow.

- 1 J. M. D. Olmsted, J. exp. Zool. 31, 369 (1920).
- 2 R. M. May, J. exp. Zool. 42, 371 (1925).
- 3 T. W. Torrey, J. comp. Neurol. 59, 203 (1934).
- 4 C. E. Wagner, Anat. Rec. 115, 442 (1953).
- 5 R. Kamrin and M. Singer, Am. J. Physiol. 174, 146 (1953).
- 6 J. C. Desgranges, C. r. Acad. Sci., Paris 263, 1103 (1966).
- 7 J. C. Mira, M. Pecot-Dechavassine, Pflügers Arch. 330, 5 (1971).
- 8 J. C. Mira, C. r. Acad. Sci., Paris 273, 1836 (1971).
- 9 L. Guth, Exp. Neurol. 8, 336 (1963).
- 10 A. A. Zalewski, Anat. Rec. 167, 165 (1970).

Effet du fractionnement de dose sur la survie de bourgeons axillaires et de cellules isolées de liseron irradiés aux rayons gamma

Split-dose recovery after gamma-irradiation of in vitro cultivated nodes and single cells of bindweed

J. Durand¹

Biologie Cellulaire 5, Bâtiment 478, Université Paris-Sud, F-91405 Orsay (France), 7 décembre 1977

Summary. Split-dose recovery has been shown on bindweed (*Calystegia* = *Convolvulus sepium* [L.] R. Br.) nodes and isolated single cells in aseptic culture. Recovery from sublethal damage occurs within 2 h.

Depuis les premiers travaux de Elkind² sur cellules de mammifères, le fractionnement de dose s'est révélé d'un grand intérêt pour l'étude de la réaction des cellules vivantes aux irradiations. Le plus souvent, il n'y a pas additivité des effets de doses successives. C'est ce qui a été montré dans ce laboratoire sur des bourgeons de plusieurs plantes du genre *Nicotiana*^{3,4}. Pour évaluer la généralité du phénomène, nous avons choisi une espèce très différente, *Calystegia* (= *Convolvulus sepium*, le liseron commun, qui offre la possibilité de cultiver des cellules de mésophylle isolées⁵ et donc de vérifier si la non-additivité se manifeste aussi au niveau cellulaire.

Matériel et méthodes. Un stock de tiges de liseron a été constitué par bouturage in vitro sur le milieu suivant: sels minéraux de Skoog⁶, vitamines de Nitsch⁷ sans glutamine, saccharose 20 g/l, acide indolyl butyrique 1 mg/l (communiqué par L. Rossini). Les bourgeons sont prélevés sur des tiges âgées d'un mois, débarrassés de la feuille dont il ne reste qu'un fragment de pétiole. Tous les bourgeons débarrassés sont éliminés. On irradie 50 bourgeons par point. Ils sont ensuite repiqués sur le même milieu en boîtes de

Pétri. Après un mois de culture à 24°C et éclairage de 2000 lx, la fréquence de survie est évaluée: le critère en est l'apparition d'une petite tige à partir du bourgeon.

Culture de cellules isolées. Les feuilles de Liseron proviennent de plantes cultivées au Phytotron de Gif-sur-Yvette. Les cellules du parenchyme foliaire sont préparées et cultivées selon la technique de L. Rossini⁵. Après l'irradiation, les cellules sont rincées et la densité cellulaire est ajustée à 20000 cellules/ml pour tous les points. Au 7^e jour de culture, le nombre de cellules vivantes et divisées plus d'une fois (micro-colonies d'au moins 3 cellules) est compté à l'hématimètre. Le rapport de ce nombre au nombre de cellules vivantes à la mise en culture définit la fréquence de survie. Chaque point est établi sur 3 boîtes, en faisant 1 prélèvement par boîte et en comptant de 200 à 800 cellules par prélèvement.

Irradiation. L'irradiation est effectuée avec la gamma-cell au ^{60}Co de l'Institut du Radium d'Orsay (débit: 1650 rad/min). Les 50 bourgeons correspondant à un point sont placés dans des petites boîtes de Pétri (\varnothing 5 cm). Les cellules en suspension très dense sont en erlens stériles

(\varnothing 5 cm) sur une hauteur de 1 cm. Le récipient est introduit rapidement dans la gamma-cell et laissé le temps nécessaire à la dose voulue. Toutes les manipulations sont faites aseptiquement.

Résultats. La courbe dose/action sur bourgeons (figure 1, A) est une courbe à épaulement caractéristique d'une cinétique «à plusieurs coups», cas le plus fréquent dans les systèmes cellulaires, et en particulier chez les végétaux⁸. Le fractionnement de dose sur les bourgeons (figure 1, B) permet de mettre 3 faits en évidence: a) dès les intervalles les plus courts entre les 2 demi-doses de 1500 rad, la survie est supérieure à la valeur obtenue après la dose simple de 3000 rad: il n'y a pas additivité; b) le plateau est atteint dès

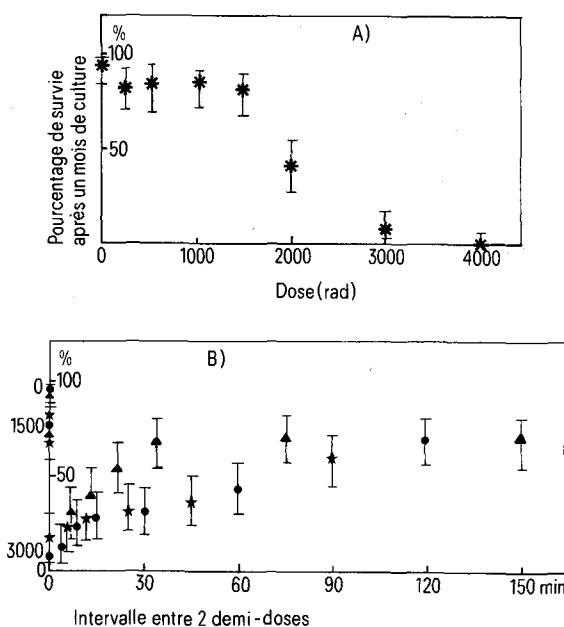


Fig. 1. Irradiation de bourgeons de lisuron cultivés *in vitro*. A) Effet d'une dose simple. B) Effet d'une dose fractionnée 1500 rad + 1500 rad sur l'axe des ordonnées: les doses simples témoins. ●, ▲, ★: 3 expériences indépendantes.

90 min: la réaction des bourgeons est rapide; c) le niveau atteint est de 70%, c'est-à-dire presque la valeur atteinte avec une seule dose de 1500 rad: 75%. Si les effets des demi-doses successives étaient indépendants, on atteindrait 56% seulement (0.75²). On a donc non seulement non-additivité, mais encore un effet de protection de la première demi-dose contre la seconde. La réaction des cellules isolées à une dose simple de rayons gamma (figure 2 A) est compatible aussi bien avec l'hypothèse d'une courbe à épaulement qu'avec celle d'une réponse linéaire. La définition de la dose sublétale est moins évidente: nous avons choisi 2000 rad, la dose létale 50% étant estimée à 3500 rad. La figure 2, B, montre l'évolution au cours du temps du nombre de micro-colonies vivantes formées par les cellules irradiées: une dose faible (2000 rad) a un effet stimulant sur les premières divisions, une dose forte (8000 rad) au contraire retarde leur apparition. La dose fractionnée (4 fois 2000 rad) a un effet moins drastique: il n'y a pas additivité. Après un passage par un maximum vers 6 jours, le nombre de micro-colonies vivantes décroît. Au 10th jour de culture, il ne reste une proportion appréciable de colonies vivantes que pour l'intervalle 90 min. Une autre série indépendante confirme qu'il n'y a pas additivité (figure 2, C). Une partie aliquote des cellules a été cultivée en érlens agités pendant 45 jours, période assez longue pour que toutes les cellules vivantes puissent former un cal. Les callos étaient plus ou moins nombreux selon les cas, mais leur taille moyenne n'était pas très différente, si bien que l'on peut considérer que le poids frais des callos formés reflète le nombre de cellules vivantes au début de la culture. Ces callos ont été tamisés et pesés (figure 2, D). Avec ce nouveau critère non plus, il n'y a pas additivité.

Discussion. Le critère de survie choisi (formation d'une micro-colonie d'au moins 3 cellules vivantes) fait apparaître (figure 2, A) une résistance des cellules isolées paradoxalement plus élevée que celle des bourgeons (DL 50 = 2000 contre 3500 rad). La figure 2, B, montre qu'une proportion importante des cellules est capable de subir quelques divisions, sans pour autant donner naissance à des colonies viables. Le critère choisi conduit à une surestimation de la survie. Mais l'expérience 2, D, permet de mettre en évidence le phénomène de non-additivité avec un critère complémentaire: la croissance de callos. Pour les

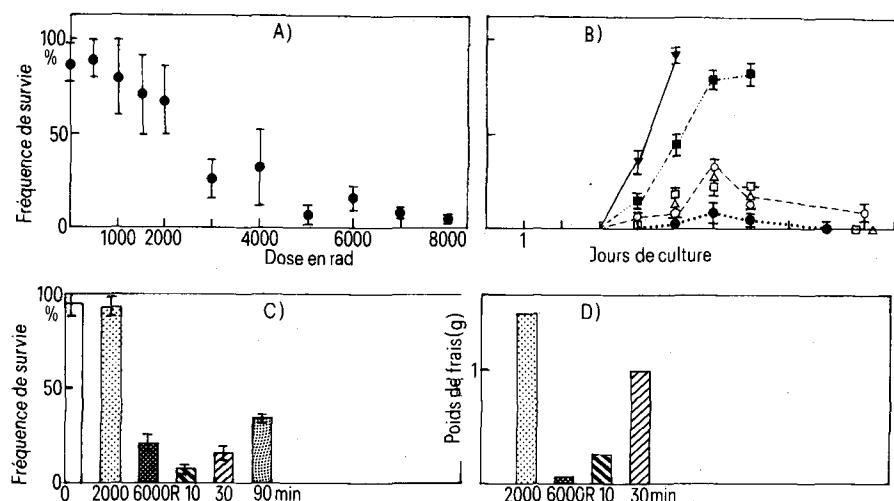


Fig. 2. Irradiations γ de cellules isolées de mésophylle de lisuron cultivées *in vitro*. A) Effet d'une dose simple sur la survie au 7th jour de culture. B) Evolution au cours du temps de cellules irradiées. ■ Témoin non irradié; ▼ une dose simple de 2000 rad; ● une dose simple de 8000 rad. Symboles ouverts: 4 fois 2000 rad séparés par un intervalle de temps. □ 10 min; △ 30 min; ○ 90 min. C) Fractionnement de dose sur cellules isolées. Dose simple: 0, 2000, 6000 rad. Dose fractionnée: 3 fois 2000 rad. Intervalles de temps entre chaque fraction en min. D) Culture en masse de cellules irradiées: des aliquotes de l'expérience C ont été cultivées en milieu agité. Les callos formés ont été pesés au 45th jour. Les points 0 et 90 min manquent. Poids frais en g pour 10^{15} cellules au début de la culture.

bourgeons, le critère de survie utilisé est correct: bien que certaines tiges semblent très faibles, les séquelles de l'irradiation disparaissent après un repiquage (résultats préliminaires).

Il ressort de nos résultats qu'il n'y a pas additivité des effets de doses successives de rayons gamma données à des bourgeons après un intervalle de récupération. Un phénomène de non-additivité se retrouve aussi sur les cellules isolées. L'intervalle de temps considéré est trop court pour qu'il y ait eu division cellulaire (figure 2, B). C'est la même population de cellules qui a reçu les doses successives d'irradiation. Il s'agit donc d'un phénomène intracellulaire. L'effet du fractionnement de dose sur la survie est bien connu chez d'autres systèmes biologiques: par exemple, la levure^{9,10} et les cellules de mammifères en culture^{2,11-13}. On observe une augmentation de la survie quand la dose est fractionnée, avec les 3 types de radiations les plus utilisées: rayons gamma¹², rayons X^{10,11,13} et UV^{9,10}. Nos résultats correspondent donc à un phénomène général.

- 1 Nous remercions vivement M^{me} L. Rossini qui nous a transmis la technique de culture de cellules de liseron. Les irradiations ont été réalisées grâce à l'obligeance de M^{me} E. Moustacchi.
- 2 M. M. Elkind et H. Sutton, *Nature* 184, 1293 (1959).
- 3 J. Mousseau, M. Delbos, E. Delcher, M. Branchard et J. Durand, *C. r. Acad. Sci., Paris* 283, 579 (1976).
- 4 J. Mousseau et M. Delbos, *C. r. Acad. Sci., Paris* 284, 1585 (1977).
- 5 L. Rossini, *Phytomorphology* 22, 21 (1972).
- 6 T. Murashige et F. Skoog, *Physiol. Pl.* 15, 473 (1962).
- 7 J. P. Nitsch et C. Nitsch, *Ann. Physiol. vég.* 7, 251 (1965).
- 8 J. Bayonove, J.N. Marien, D. Ravelomanana, A. Soler, R. Jonard, R. Marie et P. Pereau-Leroy, *Radiat. Bot.* 15, 349 (1975).
- 9 J. Kiefer, *Photochem. Photobiol.* 11, 37 (1970).
- 10 J. Kiefer, *Z. Naturforsch.* 26b, 129 (1971).
- 11 C. J. Koch, J. J. Meneses et J. W. Harris, *Radiat. Res.* 70, 542 (1977).
- 12 A. Szechter et G. Schwartz, *Radiat. Res.* 71, 593 (1977).
- 13 N.J. McNally et J. de Ronde, *Int. J. Radiat. Biol.* 29, 221 (1976).

Etude ultrastructurale des variations cytologiques induites par la lumière sur l'adénohypophyse de la caille mâle Ultrastructural study of the cytological changes in the adenohypophysis of the male quail submitted to long daily photoperiods

F. Harrisson

Rijksuniversitair Centrum Antwerpen, Laboratorium voor Anatomie en Embryologie, 171, Groenenborgerlaan, B-2020 Antwerpen (Belgium), 1 décembre 1977

Summary. The collective data obtained at the ultrastructural level in anterior pituitaries of male Chinese quails submitted to long daily photoperiods, confirm the cytological changes observed earlier in, at least, 2 types of cells of the gland. This cellular types may be the source of avian LH and FSH.

L'effet de la durée d'exposition à la lumière sur l'activité sexuelle des oiseaux est connu de longue date^{1,2}. La réaction induite par la lumière sur les gonades d'oiseaux emprunte successivement: a) la voie rétinohypothalamique³; b) la voie hypothalamo-hypophysaire⁴; c) la voie hypophysogonadique, par l'action des hormones LH, FSH et prolactine, véhiculées par le système sanguin⁵. L'intervention de récepteurs extra-rétiniens n'est pas exclue étant donné l'influence directe exercée par la lumière sur l'hypothalamus de canard⁶. Il résulte de ce qui précède, que les variations cytologiques observées dans les gonades d'oiseaux photostimulés semblent toujours induites par des modifications de l'activité sécrétoire du système hypothalamo-hypophysaire. Ce sont les modifications de l'activité endocrine des cellules gonadotropes hypophysaires qui sont décrites, au niveau ultrastructural, dans la présente étude.

Matériel et méthode. L'ultrastructure d'adénohypophyses de cailles mâles (*Excalfactoria chinensis*) soumises à la lumière continue a été comparée à celle de glandes d'animaux témoins soumis à 6 h de lumière par jour. La préservation des tissus est assurée par immersion dans une solution de tampon de Millonig contenant 4% de glutaraldéhyde pendant 1 h à 4°C (osmolalité de 754 mosmol/kg), suivie d'une post-fixation dans le tétr oxyde d'osmium à 1% dans le même mélange tampon pendant 1 h (osmolalité de 315 mosmol/kg). Les coupes ultra-fines, contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, sont examinées dans un microscope Jeol-100B. Des détails concernant la méthode furent publiés antérieurement⁷.

Résultats. Parmi les catégories de cellules observées dans les lobes caudal et céphalique, 2 types retiennent plus particulièrement notre attention par suite de modifications cytologiques marquées en rapport avec la photoperiodicité. La cellule de type I (figure 1a), surtout mais non exclusivement présente dans le lobe caudal de la glande, est une cellule de forme irrégulière contenant un reticulum endo-

plasmique peu abondant et quelques citerne ergastoplasmiques. Des granules sphériques, denses aux électrons, 100-250 nm de diamètre, sont épargnés dans le cytoplasme. Un appareil de Golgi est parfois présent; des vésicules d'exocytose sur les membranes extérieures sont rares. Dans les adénohypophyses d'animaux photostimulés (figure 1b), les citerne ergastoplasmiques prennent une énorme extension et forment même de larges espaces périnucléaires. Les grains de sécrétion semblent se déplacer vers le pôle sécrétoire de la cellule; un nombre accru de vésicules exocytotiques n'est cependant pas observé à ce pôle. Le complexe de Golgi, typiquement de forme annulaire, semble se trouver dans une phase active.

Les cellules de type II (figure 2a) sont abondantes dans le lobe céphalique, mais non-exclues du lobe caudal. Ce sont des cellules contenant peu de reticulum endoplasmique lisse et quelques vacuoles de forme plus régulière que celles observées dans le type I. Leur contenu est aussi plus dense aux électrons. Les granules sécrétaires, de taille variant entre 80 et 150 nm, sont surtout localisés à la périphérie de la cellule, qui montre d'ailleurs des points d'exocytose. Des vésicules golgiennes sont souvent présentes. Dans les hypophyses d'animaux traités (figure 2b), les modifications cellulaires les plus marquées concernent le système vacuolaire qui prend de l'ampleur et se prolonge, tout comme c'est le cas dans les cellules de type I, dans des espaces périnucléaires.

Discussion. L'étude des variations cytologiques survenant au reticulum endoplasmique et au système vacuolaire fait surgir la question de savoir dans quelles conditions les tissus ont été préservés et quelle est la valeur osmotique des différents liquides fixateurs. Des études antérieures⁷ ainsi que des études sur des adénohypophyses normales et traitées (résultats en cours de publication) ont montré l'utilité des mélanges fixateurs hyperosmotiques pour la bonne préservation de l'ultrastructure cellulaire (mitochon-