

Statistical analysis of the dose-response relationship of the S_1 and S_2 standards from 22 individual assays has been made. In 17 of these assays there were 4 responses for each of the standards, in 3 assays there were three, and in 2 assays only two responses per dose of S_1 and S_2 . Results of the analysis are as follows: Composite slope $b_c \pm S.E. = 1.41 \pm 0.14$; mean $\lambda = s/b \pm S.E. = 0.247 \pm 0.0273$; variance s between slopes = not significant at $p = 0.005$. The spread of samples was fairly large about the composite line, but much less so in individual assays. There was no significant difference between the slopes of the 22 assays when considered as a group. The constancy of the slope between assays would indicate that the composite curve may be used as a nomogram to evaluate relative activity between several samples assayed in one experiment. Classical 4-point assays with a set of standards should always be run if an accurate absolute value in MSH units/mg is desired on any given material.

This assay has been used extensively in this laboratory over the last three years to our satisfaction for determining the specific MSH activity of given materials and to follow with great accuracy purification procedures on various starting materials containing α -MSH, β -MSH or related peptides³⁻⁶.

Résumé. Les auteurs décrivent diverses modifications au test original de SHIZUME et al. pour mesurer l'activité mélanophorétique *in vitro*. Une analyse mathématique des résultats obtenus avec cet étalonnage en montre les caractéristiques satisfaisantes.

J. M. LONG⁷ and R. GUILLEMIN
Department of Physiology, Baylor University College of Medicine, Houston (Texas), and Laboratoire de Morphologie expérimentale et Endocrinologie, Collège de France, Paris, December 16, 1960.

PRO EXPERIMENTIS

Quelques commentaires sur les méthodes de culture *in vitro* de jeunes blastodermes de poulet¹

La possibilité d'opérer de jeunes blastodermes d'oiseaux non dans l'œuf, mais en culture *in vitro*, offre des avantages évidents et de longue date diverses techniques sont employées dans ce but. Le procédé courant consiste à élever le blastoderme sur un substratum nutritif ferme et fibreux. WADDINGTON² utilisait du plasma sanguin de poule et du jus embryonnaire coagulés. Depuis les investigations de SPRATT³ on ajoute de la gélose au milieu nutritif proprement dit pour lui conférer une certaine consistance. La composition de ce milieu diffère largement selon les auteurs et les buts de leurs recherches. D'après SPRATT l'albumen seul, ou mélangé au vitellus, satisfait le mieux aux besoins nutritifs de l'embryon, tandis que WOLFF et SIMON⁴ préconisent l'emploi de jus embryonnaire. Dans ces conditions de culture le développement du corps embryonnaire peut se poursuivre normalement, surtout si le blastoderme a été étalé sur le substratum après la formation des ébauches axiales. Cependant, l'extension périphérique du blastoderme est toujours arrêtée.

En 1955 NEW⁵ a démontré que cette extension est due à l'adhérence du bord d'enveloppement à la membrane vitelline laquelle doit être légèrement tendue. Le bord d'enveloppement, en s'élargissant grâce à la prolifération active de ses cellules, et en glissant sur la membrane vitelline, étire littéralement le blastoderme tout entier. Partant de ces observations, NEW a élaboré une technique de

culture *in vitro* beaucoup plus proche des conditions du développement normal. On immerge le jaune d'œuf dans une solution physiologique; on découpe la membrane vitelline autour du blastoderme selon le plan équatorial qui lui correspond. Le cercle de la membrane vitelline, détaché du vitellus, est étalé, le blastoderme en haut, sur un verre de montre et alors on pose un anneau de verre sur la membrane vitelline. Ensuite la solution physiologique est déversée du verre de montre et une petite quantité d'albumen est introduite sous la membrane vitelline. Pour l'incubation l'ensemble est mis dans une chambre humide. Dans ces conditions aussi bien le développement et la croissance du corps embryonnaire que l'extension périphérique du blastoderme se poursuivent normalement jusqu'au moment où l'embryon atteint le stade auquel, s'il était dans l'œuf, il aurait commencé à s'enfoncer dans le vitellus.

Rappelons encore que, comme NEW⁶ l'a démontré, le blastoderme absorbe l'eau de l'albumen ce qui permet à son feuillet interne de sécréter abondamment le liquide contenu normalement dans la cavité sous-germinale. Contrairement donc aux cultures, où le blastoderme est situé à l'interface du substratum nutritif et de l'air saturé de vapeur d'eau, les blastodermes élevés selon la technique de NEW se développent dans un milieu liquide normal. Une petite quantité de ce liquide s'accumule entre le blastoderme et la membrane vitelline, en formant une mince couche limitée périphériquement par le bord d'enveloppement qui adhère étroitement à la membrane, tandis que le liquide sécrété par l'entophylle le submerge d'une couche de plus en plus épaisse.

Là méthode de NEW, si satisfaisante soit-elle, présente, néanmoins, un certain désavantage: elle ne permet guère de pratiquer sur les blastodermes cultivés de multiples interventions expérimentales lesquelles doivent être faites du côté dorsal. Si l'on détache le blastoderme pour le remettre en sens inverse sur la membrane, le bord d'enveloppement, grâce à l'affinité de sa face externe pour la membrane vitelline, s'enroule et après quelque temps le blastoderme prend la forme d'une vésicule. Récemment, NEW⁷ a essayé d'étaler le blastoderme, sa face ventrale en bas, sur la face externe de la membrane vitelline. Dans cette position, le bord d'enveloppement n'adhère pas à la membrane et ni son enroulement ni extension périphérique du blastoderme n'ont lieu. Signalons à ce propos un fait que NEW semble ignorer: la membrane qui englobe la sphère vitelline d'un œuf pondu est en réalité composée de la membrane vitelline proprement dite et d'une mince couche d'albumen extrêmement visqueux, le même qui forme les chalazes. Si ce n'était pas le cas, leur fixation sur le globe vitellin aurait été incompréhensible. D'autre part, pendant le passage du vitellus dans la trompe, de petites hémorragies se produisent fréquemment et alors des caillots de sang se déposent sur la membrane vitelline. Or, les coupes histologiques de cette dernière, prélevée sur un œuf pondu, montrent que ces caillots, pourvu qu'ils soient suffisamment minces, sont englobés entièrement dans les couches superficielles de la «membrane vitelline».

Afin de trouver une technique de culture permettant d'opérer aisément des blastodermes du côté dorsal et garantissant simultanément leur extension périphérique

¹ Travail subventionné par le Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

² C. H. WADDINGTON, Phil. trans. Roy. Soc. B, 221, 179 (1932).

³ N. T. SPRATT, J. exp. Zool. 106, 345 (1947).

⁴ E. T. WOLFF et D. SIMON, C. R. Acad. Sci. 241, 1994 (1955).

⁵ D. A. J. NEW, J. Embryol. exp. Morph. 3, 326 (1955).

⁶ D. A. J. NEW, J. Embryol. exp. Morph. 4, 221 (1956).

⁷ D. A. J. NEW, J. Embryol. exp. Morph. 7, 146 (1959).



Fig. 1

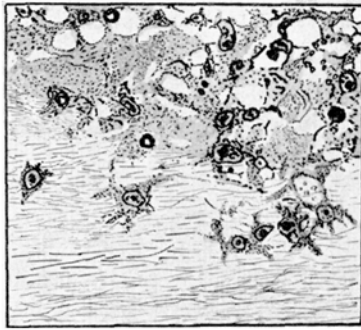


Fig. 2

Fig. 1. Bord d'un blastoderme cultivé sur le milieu solide. Le rempart vitellin dépasse périphériquement le feuillet externe lequel assume l'aspect d'un épithélium cubique. La zone périphérique de l'ectophylle, correspondant au bord d'enveloppement d'un embryon normal, est constituée par un bourrelet pourvu d'excroissances irrégulières et par un liséré composé de cellules plus aplaties.

Fig. 2. Interface du milieu nutritif à base d'agar et du rempart vitellin. Les cellules des couches profondes de ce dernier prennent la forme étoilée et pénètrent dans le substratum où elles constituent une sorte de syncytium.

normale, nous avons tout d'abord étudié en détail le comportement des blastodermes cultivés sur des milieux nutritifs contenant de l'agar et leurs rapports avec le substratum. Nous avons essayé divers milieux nutritifs, celui de WOLFF et SIMON, et ceux de SPRATT que nous avons parfois modifiés. Sur ces multiples milieux le développement des blastodermes ne présente pas de différences vraiment appréciables. En fin de compte, nous avons choisi comme «milieu standard» le mélange de la solution d'agar à 3% dans le tyrode (3 parts), de l'albumen (4 parts) et du sérum de cheval (2 parts). L'adjonction de ce dernier facilite, en effet, l'hématopoïèse dans l'aire vasculaire.

Les blastodermes, au stade de la ligne primitive, sont étalés sur le milieu nutritif et cultivés sous un contrôle fréquent pendant 24 h et plus. Ensuite, ils sont fixés au Bouin, soit détachés du milieu nutritif soit avec leur substratum, et examinés histologiquement sur des coupes sériées. Une dizaine de blastodermes ont été mesurés au début et à la fin de leur culture. Non seulement leur extension périphérique n'a pas été constatée, mais, au contraire, ces blastodermes se sont légèrement contractés. Ce phénomène semble être dû à l'élasticité du feuillet externe. Comme on le voit sur les coupes, le rempart vitellin dépasse périphériquement le «bord d'enveloppement». L'ectophylle, composé normalement de cellules fortement amincies, assume alors l'aspect d'un épithélium cubique (Fig. 1). Rappelons que le bord d'enveloppement normal est formé d'un bourrelet plus ou moins épais et d'un liséré composé d'éléments cellulaires plus ou moins aplatis et s'étalant directement sur le vitellus. La forte colorabilité de ce bourrelet au bleu de toluidine, laquelle disparaît après le traitement à la ribonucléase, semble prouver qu'il constitue la zone de prolifération cellulaire intense assurant la croissance périphérique rapide du blastoderme (GALLERA et OPRECHT⁸). L'extension de nos blastodermes étant bloquée, le bord d'enveloppement ne peut plus s'étirer et le matériel cellulaire, en s'accumulant dans son bourrelet, forme des excroissances irrégulières pénétrant plus ou moins profondément dans le rempart vitellin (Fig. 1). Ce dernier est plus épais que la norme et il se

plisse en formant des ondulations orientées radialement au corps embryonnaire. L'aire vasculaire est visiblement trop étroite par rapport à ce dernier de sorte que la tête et le bourgeon tronco-caudal de l'embryon surplombent le rempart vitellin.

L'examen des coupes histologiques des blastodermes fixés avec leur substratum a révélé que les cellules du rempart vitellin, en particulier dans sa zone périphérique, prennent la forme étoilée et pénètrent plus ou moins profondément dans l'agar imbibé de substances nutritives où elles forment un véritable réseau, reconstituant ainsi une sorte de «syncytium vitellin» (Fig. 2). Ces observations nous ont amenés à nous poser la question si l'arrêt de l'extension périphérique du blastoderme cultivé sur le substratum fibreux est exclusivement dû à l'absence de la membrane vitelline. Pour résoudre ce problème, quelques blastodermes, détachés avec la membrane vitelline du jaune d'œuf, sont étalés face ventrale contre notre milieu nutritif standard. Un anneau en verre, de diamètre plus large que celui du blastoderme, est posé sur la membrane vitelline et enfoncé dans le substratum. Cette opération est faite afin que la membrane vitelline soit uniformément tendue. Les blastodermes en question s'étalent progressivement sur le milieu nutritif, cependant leur extension est toujours sensiblement moindre que s'ils étaient cultivés selon la méthode de NEW. L'extension périphérique de nos blastodermes ne concerne, d'ailleurs, que l'ectophylle seul. Le bord d'enveloppement est toujours excessivement large, quoique ses dimensions varient considérablement d'une région à une autre. En effet, le contour externe du rempart vitellin, toujours épais et ondulé, est des plus irréguliers et dans les zones où il dessine de larges promontoires, le rempart vitellin est toujours disloqué sur de plus ou moins grandes étendues au niveau desquelles le blastoderme n'est formé que de l'ectophylle. L'examen histologique confirme entièrement ces observations faites *in toto*. Le rempart vitellin, accroché par sa face ventrale au substratum et adhérant fortement par sa face dorsale à l'ectophylle qui s'étend progressivement, se déchire par endroits et ses parties périphériques sont entraînées par le bord d'enveloppement.

Notre étude comparative nous permet de conclure que l'accrochage du rempart vitellin prohibe toute extension périphérique du blastoderme sur les milieux solides, quelle que soit leur constitution nutritive. La présence de la membrane vitelline, comme NEW l'a démontré, est indispensable à une extension normale. Nous avons donc modifié sa méthode, de façon à rendre possible des interventions du côté dorsal. A cette fin, la membrane vitelline est étalée sur un anneau de verre, le blastoderme en bas, donc en contact direct avec l'albumen. Un autre anneau de diamètre plus grand est emboîté sur le premier pour tendre uniformément la membrane vitelline et la maintenir. Les blastodermes ainsi cultivés se développent parfaitement et se prêtent bien à des colorations vitales localisées et même des interventions micro-chirurgicales peuvent être pratiquées à travers une petite incision dans la membrane vitelline.

Summary. The relationship between yolk entoblast and the nutritional medium in cultures of chicken blastoderm, classical type, was studied. In addition, some refinements to the research of NEW⁶⁻⁷, and some modifications permitting operations from the dorsal side, are proposed.

J. GALLERA et G. NICOLET

Laboratoire d'Embryologie expérimentale, Institut d'Anatomie, Université de Genève (Suisse), le 24 novembre 1960.

⁸ J. GALLERA et E. OPRECHT, Rev. Suisse de Zool. 55, 243 (1948).