

Instituut voor Zee wetenschappelijk onderzoek
Institute for Marine Scientific Research

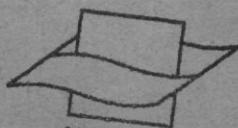
Frances Elisabethlaan 67
8401 Bredene - Belgium - Tel. 059/80 37 15

EXTRAIT DU BULLETIN

DE LA

11772

SOCIÉTÉ ROYALE DES SCIENCES
DE LIÈGE



Vlaams Instituut voor de Zee
Flanders Marine Institute

N° 11 — 1932

Étude cytologique de l'activation normale
ou provoquée par les vapeurs de chloroforme
dans l'œuf de *Petromyzon*

PAR

JEAN-M. PIRLOT et MAURICE WELSCH
Institut Ed. van Beneden, Université de Liège

BRUXELLES

MARCEL HAYEZ, IMPRIMEUR DE L'ACADEMIE ROYALE DE BELGIQUE
112, rue de Louvain, 112

1932

Étude cytologique de l'activation normale ou provoquée par les vapeurs de chloroforme dans l'œuf de *Petromyzon*,

par JEAN-M. PIRLOT et MAURICE WELSCH.

Institut Ed. van Beneden, Université de Liège.

L'un de nous a antérieurement annoncé (1) que les vapeurs de chloroforme, agissant sur les œufs vierges de la Lamproie, y provoquent des phénomènes qui, macroscopiquement, sont les mêmes que ceux qu'y détermine la fécondation (2-3). Nous avons repris cette étude dans le but de comparer les phénomènes cytologiques de la parthénogénèse chloroformique à ceux de la fécondation.

Les *Petromyzon fluviatilis* ont pu être recueillis en quantité relativement importante à l'époque du frai. Cependant, nous n'avons réussi à capturer que quatre femelles avant la ponte. Toutes les précautions nécessaires pour éviter la pollution accidentelle des œufs par du sperme ont été prises : la paroi abdominale et l'orifice cloacal des femelles sont préalablement lavés à l'alcool à 95°; puis, les œufs, prélevés par pression, sont recueillis dans des boîtes de Pétri soigneusement lavées.

Une partie importante de ces œufs, tenue en observation dans de l'eau provenant de la distribution de la ville de Liège, nous a servi de témoins. Un second lot a été fécondé et un troisième lot a été traité par les vapeurs de chloroforme.

Dans les œufs témoins non fécondés nous n'avons jamais obtenu de larve, ce qui établit qu'il n'y a pas eu de fécondation accidentelle. Cependant, quelques œufs, environ cinq pour mille, ont présenté un début de développement qui n'a pas dépassé le stade à quatre cellules. Ni Bataillon, dans ses expériences classiques (4), ni Pirlot (1-5) n'avaient observé ce phénomène. Il est peut-être dû au fait que l'eau employée comme milieu d'élevage est chargée de sels calcaires et d'anhydride carbonique. Toutefois, un essai d'activation, malheureusement isolé à cause de la rareté du matériel, a été tenté au moyen de solutions faibles d'acétate calcique et ne nous a pas donné de résultats. Nous nous proposons d'observer ultérieurement l'action de l'anhydride carbonique.

Les œufs fécondés se sont développés normalement; nous avons prélevé dans ces lots des échantillons qui ont été fixés de quinze en quinze minutes et dont une partie a été débitée en coupes. Nous avons, d'autre part, laissé une partie de ces matériaux évoluer jusqu'à éclosion. Le sperme utilisé a été prélevé le plus souvent sur des *Petromyzon fluviatilis*; une fois cependant, nous avons réalisé la fécondation d'œufs de *fluviatilis* par du sperme d'un *Petromyzon Planeri* trouvé dans un nid de *fluviatilis*. De cette fécondation nous avons obtenu 1.127 larves nageuses et 79 œufs morts, soit 93,5 % de développements jusqu'à l'éclosion.

Les œufs du troisième lot sont disposés en couche unique dans une boîte de Pétri, puis lavés. Ils adhèrent au fond de la boîte et celle-ci peut être retournée et amenée au-dessus d'une seconde boîte semblable contenant environ 5 centimètres cubes de chloroforme. Nous réalisons ainsi une chambre d'un demi-litre environ de capacité dans laquelle les œufs sont soumis pendant quarante-cinq secondes à l'action d'une atmosphère chargée de vapeurs de chloroforme. Un lavage immédiat à l'eau courante enlève l'excès de ce produit et les œufs peuvent être placés en observation.

Ainsi que l'un de nous l'avait antérieurement signalé (1), ces œufs se contractent immédiatement dans leur chorion et orientent leur pôle animal vers le haut, exactement comme le font les œufs fécondés ou piqués par un fin stylet de verre. Mais, tandis que dans ces expériences réalisées avec des œufs non lavés avant d'être soumis à l'action des vapeurs de chloroforme, on n'observait qu'exceptionnellement l'ébauche d'un sillon de segmentation, nous avons pu, en lavant d'abord les œufs, obtenir régulièrement l'apparition de deux sillons successifs, exceptionnellement davantage. L'aspect des œufs activés était semblable, quoique cependant un peu moins régulier, à celui des œufs fécondés au même stade de leur développement.

Comme il était à prévoir, les œufs traités par les vapeurs de chloroforme ne sont plus susceptibles d'être fécondés. A diverses reprises, nous en avons mis en présence de sperme; en aucun cas nous n'avons pu réussir la fécondation.

Le matériel a été fixé par du liquide de Bouin avec ou sans acide acétique, ou encore par du liquide de Bouin-Hollande sans acide acétique. Ce dernier fixateur s'est révélé de loin supérieur aux deux autres.

Pour l'inclusion dans la paraffine, deux techniques ont été utilisées : Tout d'abord, nous avons employé la méthode classique, en abrégeant autant que possible la durée du séjour dans les bains d'alcool et dans ceux de paraffine fondu. Ultérieurement, nous avons employé la méthode au dioxane (6). Les œufs, sortant du Bouin-Hollande, ont séjourné pendant dix minutes chaque fois dans quatre bains successifs, deux de dioxane et deux de paraffine fondue ; ils ont été ensuite immédiatement enchaissés. Quant aux œufs traités au Bouin ordinaire, il a été indispensable de les placer durant vingt-quatre heures dans de l'alcool à 75° pour compléter leur fixation.

Les œufs de Lamproie enchaissés par la méthode au dioxane peuvent être débités en coupes avec une remarquable facilité. Nous avons employé des coupes séries d'une épaisseur de quinze microns ; seule l'étude des plus jeunes stades, où le noyau ovulaire est aisément masqué par les tablettes vitellines, doit être faite sur des coupes plus minces.

La coloration de nos préparations a été faite au liquide Biondi, qui nous a donné des résultats généralement satisfaisants. D'autres colorants ont été essayés avec un moindre succès.

L'étude des œufs vierges, fécondés ou activés, étant loin d'être actuellement terminée, nous nous bornerons à décrire brièvement certains stades caractéristiques.

L'œuf fécondé depuis quarante-cinq minutes a complètement détaché sa membrane périvitelline. Dans une coupe passant par le grand axe de l'œuf, on peut distinguer le pôle animal plus effilé que le pôle végétatif. La plus grande partie de l'œuf consiste en une zone centrale chargée de grosses plaquettes vitellines. Elle est entourée d'une bande corticale où les grains vitellins relativement petits sont extrêmement serrés ; toutefois, cette région à grains fins s'étend en une large plage qui constitue le pôle animal.

Dans la plage à grains fins, nous trouvons, au pôle animal, une région protoplasmique hyaline presque entièrement dépourvue de grains vitellins. Alors que chez l'œuf vierge cette « zone polaire » formait une calotte strictement périphérique, ici elle constitue une masse pyriforme enfoncée dans la région à grains fins et atteignant la périphérie par un large pédicule. Cette modification indique le début d'un mouvement de migration centrifuge qu'exécute ce plasma polaire au début de l'évolution de l'œuf. Du côté du centre de l'œuf, le plasma hyalin est limité par une « bande ondulée » plus sombre, inexiste chez l'œuf

vierge. Les coupes heureuses nous montrent, dans le plasma polaire, la tête du spermatozoïde sous l'aspect d'un bâtonnet chromatique. L'aster spermatique commence à se développer entre ce bâtonnet et la périphérie de l'œuf. A quelque distance du plasma polaire nous trouvons, à la surface de l'œuf, une très légère élévation au niveau de laquelle se trouve un fuseau; c'est le noyau ovulaire en mitose préparatoire à l'émission du second globule polaire.

Sauf qu'il n'y a dans le plasma polaire ni tête, ni aster spermatique, l'œuf activé du même âge montre les mêmes différenciations : le plasma polaire a également été fixé au cours de sa migration centripète; il présente la bande onduleuse qui apparaît dès le début de ce mouvement; enfin, la mitose du noyau ovulaire a le même aspect que dans l'œuf fécondé.

Au cours des deux heures qui suivent, nous pouvons observer, dans les œufs fécondés comme dans les œufs activés, la migration du plasma polaire. Toutefois, il reste en relation avec la périphérie par un pédicule de plus en plus long et de plus en plus étroit, autour duquel s'accumulent de grosses vacuoles. La bande onduleuse s'étale. Le noyau ovulaire se reconstitue. En outre, dans les œufs fécondés, on peut suivre le développement, puis la régression de l'aster spermatique et la transformation de la tête du spermatozoïde en un noyau vésiculeux.

Entre trois heures et trois heures et demie, il se passe un phénomène dont nous n'avons pas encore pu suivre en détails les diverses étapes; c'est la migration du noyau ovulaire de la périphérie vers le plasma polaire; cette migration se réalise tant dans les œufs fécondés que dans les œufs activés.

Dans l'œuf fécondé de trois heures et demie, le plasma polaire a pris une position plus centrale, sa position définitive, à la limite de la zone corticale; le pédicule qui le rattachait à la périphérie a presque entièrement disparu, mais la trainée de grosses vacuoles persiste encore. La bande onduleuse est en voie de disparition. A quelque distance l'un de l'autre, dans le plasma polaire, se trouvent les deux pronucléi.

L'œuf activé du même âge présente un aspect tout à fait analogue, mais, évidemment, ne montre qu'un seul proclucléus au niveau de la zone polaire.

Au cours des trois heures suivantes, nous assistons, dans les œufs fécondés, au rapprochement de deux pronucléi.

Dans les œufs fécondés depuis six heures et demie, le plasma polaire a pris une forme caractéristique : il s'est étalé en une

sorte de cuvette dont le bord relativement mince est relevé vers le pôle animal, tandis que son fond, légèrement épaisse, contient les deux pronucléi accolés, mais parfois nettement distincts. Dans certains œufs du même âge, on trouve déjà des figures de division complètement constituées et celles-ci sont constantes dans les œufs âgés de sept heures. A huit heures et demie, la division nucléaire s'achève; le plasma polaire s'est divisé en deux zones encore réunies par un pédicule. L'ensemble de la figure a l'aspect d'un haltère. Dans chacune de ces deux zones se trouvent un aster en régression et un noyau vésiculeux en voie de reconstitution. A neuf heures, les phénomènes nucléaires sont terminés et le premier sillon de segmentation apparaît au pôle animal.

Dans les œufs activés de cinq heures trois quarts et six heures, le plasma polaire subit la même déformation en cuvette que celle que l'on observe dans les œufs fécondés depuis le même temps. Le fond épaisse de la cuvette contient le noyau sous la forme d'une tache arrondie, colorable, pourvue de limites assez nettes et dans laquelle il nous a été jusqu'à présent impossible de révéler une structure certaine. Une heure plus tard, la figure nucléaire, plus complexe, comporte un halo foncé entourant quelques vésicules claires, accolées, et dans chacune desquelles nous distinguons des filaments disposés en fuseau. Nous n'avons pu y mettre en évidence à coup sûr des éléments chromatiques.

Ultérieurement halo et filaments disparaissent, les vésicules confluent et la figure reprend l'aspect d'un noyau au repos. Ni la zone polaire, ni le noyau ne se divisent, mais dans un lot d'œufs nous avons noté l'apparition d'un sillon au pôle animal.

Il était particulièrement intéressant de comparer à ces œufs fécondés ou activés les œufs témoins vierges, qui ont séjourné cinq heures et demie dans l'eau. Dans ceux-ci, le plasma polaire a conservé sa forme de calotte strictement périphérique, la bande onduseuse n'est pas apparue et le noyau ovulaire n'a pas gagné cette région; on le retrouve en dehors du plasma polaire, à petite distance de la périphérie, sous la forme d'un fuseau orienté obliquement par rapport à celle-ci. En un mot, ils ne diffèrent morphologiquement en rien des œufs vierges récemment pondus; le séjour prolongé dans l'eau n'a causé chez la majeure partie d'entre eux aucune activation.

Dans les œufs fécondés depuis douze heures et demie, le premier sillon de segmentation a atteint le pôle végétatif; dans chaque blastomère nous trouvons une figure mitotique préparatoire à la seconde segmentation.

Dans les œufs activés depuis le même temps, le plasma polaire subit une seconde fois la déformation en cuvette que nous avons signalée; le noyau unique prend à nouveau l'aspect d'une tache colorée et repasse par les phases décrites à propos des œufs âgés de cinq heures et demie à sept heures. Dans tous les lots, vers treize heures trente, il apparaît au pôle animal un sillon qui divise l'œuf en deux portions le plus souvent inégales. Le plasma polaire peut rester tout entier dans un des deux lobes ou se répartir entre ceux-ci. Mais en aucun cas, au cours d'une recherche attentive, nous n'avons trouvé plus d'un noyau. Nous n'oserrions affirmer cependant qu'une petite portion nucléaire ne peut se trouver dans le fragment que nous croyons anucléé. Toutefois, cette hypothèse nous paraît peu vraisemblable : d'abord nous n'avons jamais retrouvé ce fragment; ensuite, lors des cycles d'activité nucléaire, le noyau réapparaît au milieu de la tache colorée et nous n'avons jamais rien vu de chromatique à la périphérie de cette tache.

Vers quinze heures et demie, les œufs fécondés se segmentent pour la troisième fois; à la même heure, le noyau, toujours unique, de chaque œuf activé montre un troisième cycle d'activité auquel succède un second sillon qui divise l'œuf en trois ou quatre lobes.

Il semble qu'au cours de ces cycles d'activité le noyau subit une augmentation de volume et devient plus colorable. Dans le protoplasme des œufs apparaissent au pôle animal de nombreuses vacuoles transparentes, visibles sur le vivant; c'est le début d'une désorganisation de l'œuf. Pour cette raison, nous avons cessé nos fixations séries.

Mais nous avons constaté, quarante-six heures après l'activation, par le chloroforme, dans des œufs très chargés de vacuoles, en voie de cytolysé, la présence de plusieurs fragments nucléés entourant une cavité de segmentation. Les noyaux sont relativement gros et colorables. Une figure, malheureusement isolée, nous donne à penser que ces noyaux se sont formés par un phénomène d'amitose.

En résumé, nous pouvons conclure que les vapeurs de chloroforme, agissant sur les œufs vierges de *Petromyzon fluvialis*, y provoquent l'apparition de phénomènes macroscopiquement identiques à ceux qu'entraînent la fécondation ou la piqûre par un fin stylet de verre. Elles déclenchent également l'achèvement de la maturation de l'œuf, la migration centripète du plasma polaire et du noyau ovulaire. Ces phénomènes évoluent exacte-

ment comme après la fécondation, cependant que les œufs vierges, conservés comme témoins, restent complètement inertes. Enfin, les vapeurs de chloroforme entraînent des phases d'activité nucléaire parallèles aux phénomènes mitotiques de la segmentation de l'œuf fécondé.

Nous croyons pouvoir comparer ces phases d'activité nucléaire aux variations cycliques décrites par Brachet, Herlant, Hindle et d'autres dans les noyaux et le protoplasme de divers œufs en voie de parthénogénèse abortive. Les cycles d'activité que nous constatons correspondent aux monasters signalés par ces auteurs.

A la suite de ces phénomènes nucléaires, le protoplasme de l'œuf subit une fragmentation irrégulière en deux, trois ou quatre éléments, quoique le noyau reste probablement indivis. Ce n'est que dans des œufs déjà très désorganisés que l'on peut observer l'apparition de plusieurs noyaux.

BIBLIOGRAPHIE.

- (1) PIRLOT. — L'action des vapeurs de chloroforme sur les œufs de *Petromyzon fluviatilis*. (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, XCIII, 1023.)
- (2) CALBERLA. — Die Befruchtungsvorgang beim Ei von *Petromyzon Planeri*. (*Zeitsch. f. wiss. Zool.*, 1878, XXX, 437-479, 3 pl.)
- (3) NUEL. — Quelques phases du développement du *Petromyzon Planeri*. (*Arch. Biol.*, 1881, II, 403-454, 2 pl.)
- (4) BATAILLON. — Nouveaux essais de parthénogénèse expérimentale chez les vertébrés inférieurs. (*Rana fusca* et *Petromyzon Planeri*). (*Arch. f. Entw. d. Organis.*, 1904, XVIII, 1-56, 12 fig., 4 pl.)
- (5) PIRLOT. — L'activation traumatique des œufs de *Petromyzon fluviatilis*. (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, XCIII, 830-831.)
- (6) GRAUFNER u. WEISSBERGER. — Ueber die Verwendung des Dioxans beim Einbetten mikroskopischer Objekte. (*Zool. Anz.*, 1931, XCVI, 204-206.)

