

APERÇU, PARFOIS PROSPECTIF, DES RECHERCHES CONCERNANT LA PARTHÉNOGENÈSE EXPÉRIMENTALE

par

Albert M. Dalcq

Université Libre de Bruxelles.

La parthénogénèse expérimentale a été, au début de ce siècle, l'un des thèmes de recherche de la Station biologique dont il nous est donné aujourd'hui de célébrer le Centenaire. Lorsque Yves Delage s'est attaqué ici à ce problème, les processus initiaux du développement étaient déjà connus dans une large mesure, dont il n'est pas inutile de récapituler les traits essentiels.

Rappel des notions d'embryologie et de cytologie établies au tournant du siècle.

A la fin du 19^e siècle, les cas de parthénogénèse naturelle avaient, pour la plupart, été répertoriés et la possibilité avait été entrevue de provoquer artificiellement le développement des œufs vierges chez des espèces où ils étaient normalement voués à l'inertie. A cette époque, les solides fondements de la Cytologie avaient été établis, en intime liaison avec ceux de l'Embryologie. D'illustres pionniers avaient reconnu la distinction entre le noyau et le cytoplasme, montré l'existence du centrosome, observé le déroulement de la mitose et caractérisé ses étapes. Il était reconnu que la prophase présente, lors de la formation des gamètes, une modification profonde, sorte de cérémonial maintenant désigné sous le nom de méiose, qui comporte la conjugaison des chromosomes puis le déroulement spécial de deux mitoses dites de maturation, les dernières dont sont capables, et encore, les lignées génitales des deux sexes. On savait aussi que, dans le testicule de tous les groupes zoologiques, cette maturation des gamètes est constamment poussée jusqu'à son terme, qui est le spermatozoïde accompli, tandis que, dans l'ovaire, la production de réserves vitellines a pour corollaire un retard souvent considérable dans l'achèvement de la maturation, celle-ci s'attardant longuement, après les préliminaires de la méiose, à un stade de gros oocyte nanti d'un noyau relativement énorme, la vésicule germinative. De plus, on avait reconnu que lorsque cette vésicule se flétrissait, reprise d'activité annonciatrice de la ponte ovarienne, la division mitotique se produisant alors évoluait vers une cytodièse fortement inégale, avec expulsion d'un minuscule globule polaire, et que ce mode abortif de division, qui économise les réserves de l'ovule, se répéterait pour l'émission du second globule polaire. On avait également appris que le déroulement spontané de la maturation ovulaire jusqu'à son terme d'ootide était exceptionnel et pratiquement réservé aux seuls Oursins, tandis qu'ailleurs l'achèvement de la maturation était subordonné à l'intervention du spermatozoïde fécondant, le blocage survenant, selon les groupes, soit au stade encore nanti de sa vésicule germinative, soit en équilibre métaphasique de la première mitose de maturation, cas relativement peu fréquent, ou plus souvent de la seconde cinèse.

Il n'est pas inutile de rappeler aussi qu'à cette époque où les plus

chenus d'entre nous étaient encore des enfants, l'Embryologie expérimentale avait déjà posé des jalons d'une réelle importance, grâce à des précurseurs aussi notoires que Wilhelm Roux, Chabry, Driesch, Edmund Wilson, Herlitzka, Oscar Hertwig, Max Schultze, Albert Brachet, Thomas Morgan... On avait donc appris à manipuler les œufs, à pratiquer la fécondation artificielle, on avait accédé à la notion de localisation germinale, découvert chez l'Oursin, l'Amphioxus, le Triton, l'aptitude des premiers blastomères à la régulation. L'importance du problème que posent l'inertie de l'œuf vierge et sa levée par la fécondation s'était donc imposée à l'esprit des biologistes. Joints au développement prestigieux de la Chimie organique et à l'essor déjà marqué de la Biochimie, ces antécédents se conjuguaient pour rendre possible, sinon aisée, l'entreprise de la parthénogénèse expérimentale.

TRAVAUX D'YVES DELAGE, JACQUES LOEB
ET EUGÈNE BATAILLON.

Les débuts de cet effort se situèrent, comme on sait, dans deux Stations de biologie maritime, celle où nous siégeons à présent et celle de Woods Hole. C'est dans un local assez pittoresque, que j'ai encore pu visiter vers 1922, qu'Yves Delage s'installa pour ses essais sur l'Etoile de mer et sur l'Oursin. Chez *Asterias glacialis*, il atteignit assez rapidement un résultat aussi important pour la fécondation que pour la parthénogénèse, en démontrant la modification décisive que provoque dans le cytoplasme l'inondation par le suc nucléaire. La possibilité de la mérogonie, autre apport durable de Delage, est le corollaire de cette maturation cytoplasmique, une notion de valeur générale incontestée, dont le mécanisme intime reste à préciser. Ce sera une première suggestion prospective.

Les œufs vierges et mûrs, le plus souvent ceux des Oursins, ont été soumis par Delage aux traitements les plus variés, la plupart consistant en une immersion temporaire dans une eau de mer modifiée. Les réactifs les plus efficaces ont été d'une part le tanin, d'autre part la saturation du milieu par le gaz carbonique. De cette exploration obstinée s'est dégagée la présomption que la mise en marche du développement pouvait être obtenue par diverses techniques susceptibles de modifier la composition du cytoplasme. On trouvera une relation attachante de cette véritable œuvre de pionnier dans le volume publié en 1913 avec Marie Goldschmidt pour la Collection de Philosophie scientifique (Flammarion), ces petits « livres rouges » qui furent si utiles à notre génération.

De l'autre côté de l'Atlantique, Jacques Loeb, qui avait été formé, à Strasbourg, aux disciplines chimiques, remporta en 1915 un succès marquant par son invention de la méthode en deux temps qui est, sur certains Oursins, d'un rendement presque idéal. Qu'il suffise ici de rappeler qu'elle fait intervenir, d'une part un bref séjour dans l'eau de mer additionnée d'un acide gras, de préférence l'acide butyrique, d'autre part, après un lavage par le milieu normal, un séjour moins court dans l'eau de mer chargée de chlorure de sodium. L'ordre de ces opérations peut être inversé sans que le résultat soit nécessairement compromis. Si l'on suit l'ordre habituel, l'acide gras a pour effet une légère cytolysé corticale qui provoque, au retour dans l'eau de mer, le soulèvement de la membrane, comme si l'œuf avait été

fécondé. Toutefois, ces œufs ne se développeront pas, bien qu'on puisse déceler un éveil de leur métabolisme respiratoire. Ils sont simplement *activés*. Leur pronucléus va gonfler, une vaste irradiation l'entourera puis, à la longue, un *cycle mono-astérien* s'engagera et se répétera lentement. Le traitement hypertonique, appliqué au moment voulu, apparaît donc salvateur. En somme, il s'agit d'une recette empirique, dont l'intérêt n'est pas tant dans la proportion des segmentations obtenues que dans la production artificielle du soulèvement de la membrane, l'obtention de l'activité anormale dite activation et aussi dans le fait que la solution hypertonique, pour peu que son dosage soit inadéquat, suscite un ou plusieurs asters accessoires. Faisant une entorse à l'ordre chronologique des progrès de cette analyse, notons que ces menues irradiations sont bel et bien des centrosomes néoformés. En effet, ces asters accessoires ont, comme l'a montré H.J. Fry en 1928, toutes les capacités dynamiques des centrosphères normales. D'ailleurs, leur examen au microscope électronique a permis à Dirksen (1968) d'y déceler la microstructure caractéristique des centres cellulaires, avec la paire de centrioles qui en sont la signature.

Mais, reprenons le fil de l'Histoire en faisant entrer en lice Eugène Bataillon et sa parthénogénèse traumatique des œufs de Grenouille. Cette étonnante découverte, faite en 1910, est le fruit d'une intuition surgie au cours d'une étude de l'hybridation entre Anoures et Urodèles. Examinés sur coupes sériées, des œufs de Crapaud, qui avaient été imprégnés de sperme de Triton alpestre et, de ce fait, activés, montraient les grosses spermies étrangères fichées, sans plus, dans la couche corticale de l'œuf. Or, c'était aussi la période du frai des Grenouilles rousses. Sur le champ, Bataillon prélève des œufs vierges et mûrs, les pique individuellement avec une fine aiguille et constate bientôt, émerveillé, que la majorité des opérés se divisent en deux blastomères et poursuivront leur segmentation.

L'admirable analyse expérimentale qui fut alors menée à Dijon jusqu'en 1919, réservait une autre surprise. En fait, l'acte unique de la piqûre implique deux opérations combinées. Il y a perforation de la membrane plasmique, mais aussi inoculation fortuite d'une cellule provenant du peu de sang qui a souillé les œufs au cours de leur prélèvement. Si les précautions nécessaires sont prises pour éliminer ce facteur insidieux, l'œuf seulement piqué montre simplement le tableau de l'activation : soulèvement de la membrane, achèvement de la maturation par l'expulsion du second globule polaire, perte de la fécondabilité, engagement dans des cycles mono-astériens qui doublent plusieurs fois de suite le nombre de chromosomes. En revanche, si l'inoculation a eu lieu, la cellule introduite agit comme un « levain de gel » et provoque une vaste irradiation du cytoplasme. Quand celle-ci a régressé, un édifice mitotique bipolaire assure une première division normale. La segmentation se poursuivant, un embryon se formera. Ainsi, l'activation pure et simple laisse l'ovule dans un état de monocentrie dont il ne peut sortir par ses propres moyens. L'introduction d'une cellule étrangère qui peut être quelconque suscite une *régulation* qui assure l'acquisition de la dicentrie, grâce à laquelle une première mitose typique, bipolaire, engage la segmentation normale.

Dès ce moment on peut, sans s'arrêter au rappel d'interprétations

invocant, non sans quelque pertinence, un état d'hypertension ou d'intoxication de l'œuf vierge et le rôle probable d'un changement de perméabilité, introduire une notion générale que Bataillon a surtout exposée dans son admirable « Enquête de trente-cinq ans sur la

3) 2 juin. Astériacées ~~recouvertes~~ mises dans ~~un~~ étang de minutes dans un tube, ~~recouvertes~~. En 2 heures tout disparaît. Je la brûle au moment de l'éclatement plan. 3 juin. Recouvertes ~~par~~ mousse mais au day bon nombre disparaît. 4 juin. Ma pas éclat

2 bis est très bon - grain moyen et l'appartient à la
moyen en forme conique, à la surface. Je le suis sûr,
école N° 2.

7 juillet. Allumé par un élé. le ram d'els malade. le fléaupeut-est un fort
vieux fléaupeut noir. i-encoupe tourment des luis nuanhane. jette, un peu. l'au-
re du  Je me demand - si d'autre pas le fléaupeut
du 1^{er} globe. plain que saut le cau. Poule n'importe faire. S.

5) 7 juillet - Le même itinéraire que 4. une fois une fois de plus. La traîne par Co² G, une fois de plus de même, avec glob. jaune, la autre fois 1^{er} globe.

2) Je ferai une cloche 2 fois avec la cloche de 2 bis; on l'aura en un grand
nouvelles cloches qui regardent. Je n'aurai pas de cloche avec une cloche de 2 bis
j'en préférerais une plus élevée. — Ajuster une autre cloche de 2 fois en papier pour boucler certains morceaux, protéger un long
tube de verre contre.

1, 2, Je vise à leur avouer au contraire à l'avenir à flétrir et à empêcher par un édit royal, rapporté éloigné par décret.

Extrait du cahier d'expériences d'Yves Delage.

génération », ouvrage posthume publié en 1955 par les soins de Jean Rostand. La formulation lapidaire de cette notion clarificatrice est que *la parthénogénèse artificielle est le plagiat de la fécondation*. A la lumière des analyses convergentes des événements survenant dans ces deux conditions, il se dégage, en effet, un remarquable parallélisme cytologique.

Dans la fécondation, l'introduction du centrosome spermatique produit constamment un premier cycle d'activité s'exprimant par un mono-aster qui régresse bientôt. Toutefois, cette sorte d'essai fait qu'au cycle suivant la dicentrie est acquise et permet l'édification d'un

3^{me} aout

Sur la flèche de gauche - écrit noir 7c et 7d.

Soulalune : Ce rôle ont progressivement diminué. Un jour a plus actuellement que 10. En 1^{re} belle, 6 ou 7 belles, le reste nul ou presque.

2, 3, 4, 5, 6, comme l'ont fait, sans que la proportion de survie soit notable - écrit noir

7 qui était tenté par addition progressive n'allait pas bien mal la n° 7 au régime de 4 astéries. C'est tout le régime.

7ème jour le n° 1 nouveau, les 1, 3, 4, 5, 6, 7 : il y a au tout 50

Elle s'est tout traité par survie totale à jeudi quatrième de la totalité de leur cas qui n'est pas très encourageant (1/2). Cela devrait 7 nouveau formé par la réunion de 2 et 5, même traitement, mais au plus difficile. Il y en a maintenant au tout 96.

Sur l'appareil digestif, bien meilleure réaction

Le plus beau est 14 - je le déroule en

Le 1^{er} noir, clair, même traitement, j'y note 6, 17, 20 belles, le nouveau = aucun à droit, j'arrive à 17 plus belles, il en note 54.

Le n° 2 et 3, bleu et l'anti à vitellus tout réuni en un 2 bleu.

Le n° 1, - bleu simple de large et très tout petit

Dans le cas, le 3 sont laissé très petits, mais 2 et 3 sont très mal engagés par œufs. Dans les deux cas, mais nullement arrivés. Rythme 300 de 114 jours, 113 jours, 112 jours, 111 jours, 110 jours, 109 jours, 108 jours, 107 jours.

Le 4 bleu auquel il a tout arrivé sauf 10, 12, 14, 16 belles, le 5 bleu clair parfait, long, les nageoires très bien développées et haut. Le rétine est plus ou moins, en 2 n'importe, mais de chaque côté, rencontrant un haut jusqu'à pres de la portion postérieure et l'antérieur auxiliaire, la gauche avec canal hydrogène mais pas trace des siphonostomes de l'hydrogène.

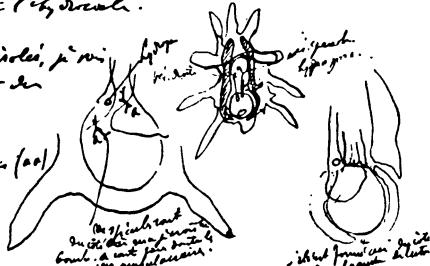
12 aout. Au niveau des trois lobes courts isolés, j'en ai mis un peu sur l'astéria. Il n'a pas fait de

petit dorsal →

13 aout

2 n° 14 ! dorsal, comme au (10)

Plastiné à court comme au : →



Extrait du cahier d'expériences d'Yves Delage.

premier édifice mitotique bipolaire qui inaugure les cycles de segmentation.

Lorsqu'on active des œufs d'Oursin selon le premier temps de Loeb, on y engendre bien une gélification astérienne, mais elle n'a pas le caractère progressif du mono-aster spermatique ; elle piétine sur place et s'épuise en vains efforts de lobulations désordonnées. Le

second temps vient corriger cette tendance abortive ; grâce à la pénétration, au moment opportun, de « certains » éléments minéraux, le premier cycle mono-astérien, abrégé, devient efficace et une modification intime assure qu'une belle mitose normale lui succède. De même, quand on pique « simplement » un œuf de Grenouille, sa membrane vivante réagit comme elle l'eût fait au spermatozoïde, mais l'éveil des activités internes ne conduit qu'à la série infructueuse des cycles mono-astériens. Si, toutefois, les conditions de la piqûre ont permis l'introduction d'une cellule, sa présence — Bataillon incriminait le noyau inoculé, mais cette interprétation ne paraît pas rester valable — amende la nature intime du mono-aster et dès le second cycle, à la gélification, devient bipolaire. On en sait plus à présent, comme nous le dirons bientôt, sur le sens profond de ces constatations, mais c'est le mérite du grand zoologiste et cytologiste, auteur de ces mémoires travaux, de les avoir alors interprétées correctement. Le secret des techniques de parthénogénèse est de s'approcher autant que possible, par d'insidieux détours, des événements intimes de la fécondation ; elles en réalisent donc bien le plagiat.

L'ANALYSE CAUSALE DU DÉVELOPPEMENT PARTHÉNOGÉNÉTIQUE, JUSQU'AU MILIEU DU SIÈCLE.

Cependant, cette formulation judicieuse laissait intact le problème des facteurs en jeu dans ces processus, mais déjà se dessinait le mouvement qui allait se consacrer à en analyser les causes. Il convient de rappeler à ce propos les recherches réalisées de 1910 à 1920 par Maurice Herlant. Sa dernière contribution, le cycle de la vie cellulaire dans l'œuf activé, établissait que l'œuf d'Oursin une fois activé ou fécondé s'engage dans une succession de phases où les propriétés de sa membrane plasmique et, sans doute, du cytoplasme évoluent cycliquement en fonction des activités centro-nucléaires. Après la disparition prématurée de ce cytologiste exceptionnellement doué, Albert Brachet me suggéra de venir étudier à Roscoff les œufs d'Astérie en maturation, afin de voir si une évolution cyclique du cytoplasme y serait déjà décelable.

Je me livrai donc à la confection de milieux artificiels de composition variée en veillant, par cryoscopie, à leur conférer une pression osmotique définie et je m'efforçai de voir si les œufs immersés dans ces solutions aux divers stades de la maturation réagiraient différemment. Ces essais firent apparaître une différence évidente entre les oocytes nantis de leur vésicule germinative et ceux entrés en maturation, mais le déroulement des deux mitoses s'opérait sans que des signes convaincants d'évolution cyclique se manifestassent.

Toutefois, mon attention fut attirée par une modification singulière de l'édifice mitotique dans les milieux qui ne permettaient pas l'expulsion du 1^{er} globule polaire. Ce blocage de la cytodièse surveillait à la fois dans l'eau de mer rendue hyper- ou hypotonique ou sérieusement enrichie en cations bivalents, spécialement en Ca^{2+} . Dans ces diverses conditions, je pouvais discerner *in vivo* une véritable hypertrophie de l'édifice mitotique. Dans les œufs soumis à l'hypertonie,

il formait un bloc pluripolaire peu lisible mais, dans les milieux isotoniques ou hypotoniques, la subdivision du centre profond était évidente, parfois aussi celle du pôle externe. A la longue, ces mitoses pluripolaires aboutissaient souvent à la formation d'un globule polaire géant, premier indice d'un travail mitotique accru. Dans les mélanges isotoniques à prédominance de Mg^{2+} et surtout de Ca^{2+} , je remarquai bientôt des signes d'activité plus générale, parfois une cytotétrèse pure que j'ai décrite sous le nom d'*autonomie végétative*, parfois une esquisse de segmentation. Dès lors, un opportunisme compréhensible m'orienta vers la possibilité d'une parthénogénèse axée sur un enrichissement du milieu en cations bivalents.

Ma confiance dans ce procédé, tout au moins pour le matériel que je manipulais, devint très ferme en constatant que chez une femelle dont les gonades ne contiennent que des oocytes au repos — vérification nécessaire car, au moment physiologique de la ponte, l'entrée en maturation peut survenir dans l'ovaire — l'immersion d'un des ovaires dans l'eau de mer hypercalcique provoque *in situ* le flétrissement des vésicules germinatives (1). La suite du travail a simplement consisté à répartir des oocytes dans des mélanges isotoniques contenant des proportions diverses de chlorures de sodium, potassium, magnésium et calcium, à les y laisser faire leur maturation, souvent anormale, et entrer plus ou moins en développement, puis à comparer les signes d'activité centro-nucléaire et cytotétrèse qui s'y manifestaient, en dehors de tout retour au milieu normal. Toutes les pontes ne réagissent pas au même degré, mais la proportion des segmentations plus ou moins typiques est toujours plus grande en présence d'un excès de bivalents, avec abondance de calcium.

Du point de vue prospectif, il me plaît à dire que ce travail est resté inachevé et imparfait. Une grave critique réside dans le fait que, si la pression osmotique a été soigneusement mesurée, les milieux sont restés non tamponnés, et leur pH, dont la notion était toute récente, n'a pas été évalué. Les solutions pures des quatre chlorures et leurs mélanges avaient vraisemblablement un pH inférieur de 1 à 2 unités à celui de l'eau de mer. Ici se présente une deuxième suggestion prospective. Si ces conditions étaient amendées, on parviendrait éventuellement à réduire l'hétérogénéité des aspects cytologiques que montrent les cultures dans les divers milieux et l'on pourrait dès lors préciser la relation entre les cations présents et les diverses modalités d'activité centro-nucléaires, ce qui ne manquerait pas d'intérêt, surtout si l'on poussait l'enquête vers la détection cytochimique de certaines phosphatases. Mais il y aurait d'autres raisons, et plus profondes, de reprendre ces investigations, surtout quant à la modification initiale

(1) Récemment, R.W. Merriam a montré que la présence des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} est nécessaire, chez le Xénope, pour obtenir le flétrissement de la vésicule germinative sous l'influence de la progestérone (*Exp. Cell Res.*, 68, pp. 75-80 et 81-87, 1971, surtout le premier de ceux-ci).

D'autre part, Yanagimachi signale que pour réussir la fécondation *in vitro* de l'œuf de Cobaye, la présence de calcium dans le milieu est nécessaire car, sans ce cation, la réaction de l'acrosome ne se produit pas (*Anat. Rec.*, 172, pp. 430, 1972).

Par ailleurs, le déterminisme de la ponte et de l'entrée en maturation a été puissamment éclairé, d'une part grâce à la mise en évidence d'une substance gonadostimulante (un complexe de 16 acides aminés en proportions diverses), d'autre part grâce à la découverte de l'influence maturative d'un seul composé de l'adénine, la 1-méthyladénine (réf. dans M. Kanatani et M. Shirai, *Development - Growth and Differentiation*, 13, pp. 53-64, 1971).

du premier fuseau de maturation. Ces suggestions ne se dégageront, toutefois, qu'à la lumière de travaux encore récents et menés dans un esprit beaucoup plus moderne. Avant d'en venir là, accordons une attention légitime à l'important *processus régulateur* dont le *noyau* est éventuellement le siège.

L'importance du rôle joué par le noyau semble aujourd'hui évidente à la lumière des connaissances acquises depuis 1950 environ sur le mécanisme de synthèse des protéines. Il ne pouvait en être ainsi au moment où les spécialistes de la parthénogénèse ont été frappés de la faible viabilité des embryons obtenus par leurs divers procédés.

Alors que la fécondation normale produit évidemment des embryons viables, capables de franchir une éventuelle métamorphose, il n'en va guère de même pour les produits de la parthénogénèse. Il y eut bien un Oursin, obtenu par Yves Delage à Roscoff, et une Grenouille, élevée au laboratoire de Jacques Loeb, mais ce furent des réussites exceptionnelles. On se rendit bientôt compte de ce que les rares survivants des élevages parthénogénétiques n'étaient pas restés haploïdes, comme on s'y serait attendu, mais avaient insidieusement redoublé le nombre de leurs chromosomes. Il est au moins un cas où le mécanisme de ce retour à la diploïdie a été élucidé, et c'est encore Bataillon qui y a réussi. Il a suffi pour cela qu'en 1930 il applique à des œufs d'Oursin le premier temps de la méthode de Loeb, en abaissant légèrement le titre de l'acide butyrique et en réduisant son temps d'action à 30 secondes. A la suite de cette minime modification, la membrane ne se soulève pas immédiatement, l'activité mono-astérienne ne s'éveille pas mais, à un moment plus tardif, la membrane du noyau disparaît et un édifice mitotique singulier se constitue. Son fuseau est plutôt cylindrique, ses pôles sont des sphères transparentes, sans irradiation. L'évolution de cette « mitose bipolaire anastrale », amène le redoublement du nombre des chromosomes. Si les conditions internes sont « favorables », au cycle suivant une mitose typique se constituera en même temps que, fait remarquable, la membrane d'activation se soulèvera enfin, ce qui montre bien que cet événement n'a qu'un rôle accessoire.

Ce déroulement des événements confirme que, pour assurer un développement normal, il faut obtenir l'éveil harmonieux des trois activités envisagées plus haut, celle du complexe nucléaire, celle des facteurs de gélification fusoriale puis astérienne, celle de la membrane plasmique, régulatrice des échanges. Chacune d'elles a son rythme propre et ces rythmes — intuition chère à Bataillon — doivent être dûment associés.

APPORTS DE LA BIOCHIMIE ET DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.

Cette notion générale a pu être précisée dans une certaine mesure grâce à la convergence graduelle d'informations acquises par des travaux poursuivis sur les deux matériaux déjà tant explorés, les œufs des Echinodermes, surtout ceux de l'Oursin, et ceux des Batra-

ciens. Parallèlement, les possibilités de parthénogenèse ont été scrutées chez le Lapin et la Souris. Ces travaux de Pincus, de Thibaut, de Tarkowski et de Graham, où la segmentation est obtenue en agissant sur les œufs tubaires soit par refroidissement momentané (lapine) soit par application d'un choc électrique (Souris), n'ont pas encore atteint le stade de l'analyse causale, mais c'est une voie pleine d'avenir.

Considérons d'abord sous cet angle les résultats obtenus en scrutant chez l'Oursin la synthèse des protéines. Que le développement embryonnaire implique dès son début l'éveil de synthèses protéiques est une certitude, mais le degré de participation des constituants nucléaires, à ces jeunes stades, est un problème encore débattu. A ce point de vue, il a été d'une grande utilité de pouvoir étudier la capacité de développement parthénogénétique d'un fragment anucléé d'œuf d'Oursin. C'est ce que permet la technique inventée en 1935 par Ethel Brown-Harvey. Une centrifugation appropriée permet de subdiviser par étirement les œufs vierges en deux parties, dont une seule est nucléée. En soumettant les fragments nucléés et anucléés à une hypertonie momentanée, on provoque une segmentation pas très typique, mais qui peut donner des complexes comptant jusqu'à 500 "cellules", et assez longuement viables. C'est une indication formelle de l'ampleur que peut prendre l'activité autonome de l'appareil centrosomial.

Ultérieurement, ce procédé a permis à Jean Brachet et à ses collaborateurs de préciser la nature de l'activité biochimique que l'activation suscite dans le cytoplasme. En 1963, une synthèse de protéine, aussi active dans les fragments purement cytoplasmiques que dans ceux pourvus d'un noyau, a été révélée par l'incorporation d'un isotope précurseur des protéines, c'est-à-dire d'un acide aminé marqué, la ¹⁴C-leucine. En 1965, des fragments nucléés et anucléés ont été traités par les isotopes de précurseurs des acides nucléiques et des protéines, c'est-à-dire par des ribonucléosides et des acides aminés tous marqués. Il est apparu que le cytoplasme pur contient de l'ADN et incorpore des acides aminés aussi activement que si un noyau était présent, ce qui révèle une synthèse autonome de protéines. En 1967, Brachet a précisé que cette incorporation est massive et presque instantanée — et même plus intense — dans les fragments anucléés, s'ils ont été dûment activés. Elle porte sur une ou plusieurs protéines spécifiques dont le rôle biologique reste inconnu. En 1970, le même auteur considère, en outre, comme probable une certaine synthèse d'acides nucléiques, dont il resterait à surprendre le siège, éventuellement mitochondrial mais, peut-être aussi, centrosomial.

D'autres perspectives, non moins séduisantes, ont résulté d'une conjonction qui s'est récemment affirmée entre l'analyse causale de la parthénogenèse traumatique des Amphibiens et la révélation, par la microscopie électronique, de ces minuscules agents de morphopoièse que sont les microtubules.

L'énigme posée par la parthénogenèse traumatique des Batraciens n'a guère cessé, au cours des dernières décennies, d'intriguer les biologistes américains. Grâce aux travaux du regretté Charles L. Parmenter puis de son élève John R. Shaver ainsi que d'autres chercheurs des Etats-Unis, on s'est rendu compte de ce que le facteur initiateur de la segmentation (FIS) n'est pas nécessairement, comme le pensait Bataillon, l'introduction d'une cellule nucléée. La substitution à la

piqûre, technique peu précise, de la micro-injection contrôlée a permis d'établir que ce FIS est présent dans divers extraits cellulaires et non dans leur portion nucléaire, mais bien cytoplasmique. Des globules rouges de Souris, cellules sans noyau, possèdent d'ailleurs cet agent. Celui-ci existe dans sept tissus de la Grenouille adulte au moins. Au cours du développement, on le décèle de plus en plus aisément durant la segmentation et il atteint son efficacité maximale lors de la gastrulation. Déjà Shaver, à qui l'on doit ces précisions (1953), considérait qu'une synthèse de protéines était en cause. Par ailleurs, les essais tentés avec des produits riches en acides nucléiques et en substances connexes sont restés infructueux.

Bénéficiant de cette enquête attentive, Lynn R. Fraser (1970) a repris l'étude des propriétés du FIS extrait de cinq tissus de Grenouille adulte. Cet auteur s'est assuré de ce qu'il s'agit de constituants membranaires de nature protéique. Il a aussi montré que cette substance doit être polymérisée et qu'elle émigre par électrophorèse au niveau caractéristique des microtubules. Procédant alors à l'examen, sur coupes ultrafines, de condensés extraits du cerveau de Grenouille, l'organe le plus riche en FIS, Fraser a pu y observer nombre de vésicules contenant des fragments de microtubules. Il semblerait donc que ces parcelles agiraient en ensemençant le cytoplasme de l'œuf vierge de manière à favoriser la polymérisation du matériau microtubulaire que contient celui-ci et à permettre ainsi la réduplication du centriole et la formation du fuseau mitotique.

SALVE FINALE DE SUGGESTIONS PROSPECTIVES.

La conclusion de cet auteur est certes séduisante par son accord avec ce qu'on sait à présent de la submicrostructure des centrioles et de leur possibilité largement reconnue de néogenèse. Ce n'est toutefois encore qu'une hypothèse, mais à partir de laquelle je voudrais revenir une dernière fois et toujours dans un esprit prospectif sur l'intérêt que pourrait présenter un retour à l'œuf de *Marthasterias glacialis*, cet excellent matériel. L'amplification de son premier édifice mitotique de maturation, dans les conditions énoncées plus haut, a toutes chances d'être due à une production ou une agrégation de microtubules. Or, comme on pourra le lire bientôt dans une revue de P. Dustin (1972), la formation de ces éléments est empêchée par la colchicine qui se combine à une protéine du fuseau, la tubuline, et aussi par les alcaloïdes de la Pervenche, la vincristine et la vinblastine. Le froid est, d'autre part, défavorable à la conservation des microtubules. Il serait donc indiqué d'utiliser ces indications dans l'espoir d'agir sur le remaniement du premier fuseau. En cas de succès, on pourrait y soumettre aussi les stades de segmentation obtenus en mélanges salins, où les irradiations astériennes atteignent une ampleur inusitée.

Pour le chercheur familiarisé avec les délicates techniques de la microscopie électronique, il y aurait, me semble-t-il, tout un champ d'investigations rentables à exploiter sur ce même matériel. Disons

d'abord que l'étape cruciale où se rompt la vésicule germinative mériterait une étude introductory car j'ai vu jadis, naturellement sous le microscope photonique, qu'à l'instant où le suc nucléaire envahit le cytoplasme il est tout feutré d'irradiations éphémères. Les coupes ultrafines y montreraient-elles des microtubules orientés, ou même des rudiments de centrioles ? Plus tard, le remaniement expansif du premier édifice mitotique, si facile à obtenir par simple dilution de l'eau de mer, mériterait une étude d'autant plus attrayante qu'il apparaît, dans la garniture chromosomiale, un élément chromatique de grande taille dont la nature pourrait être ainsi élucidée. Si la mise au point des milieux permettant la segmentation parthénogénétique était réalisée, comme il a été souhaité ci-dessus, l'étude — sans nul doute laborieuse — des coupes ultrafines permettrait une analyse des modifications expérimentales des associations microtubulaires réalisées dans les pôles mitotiques, les fuseaux et les irradiations astériennes, en fonction de l'intervention des divers cations, vraisemblablement avec des retentissements variés sur l'ambiance enzymatique de ces microstructures...

Il est encore un autre problème dont on peut suggérer l'examen. Comment se fait-il que le premier temps de la méthode de Loeb, le traitement ménagé par l'acide butyrique et la « simple » piqûre dans la technique de Bataillon conduisent au même effet cytologique, le tableau de l'activation avec la répétition des cycles monocentriques ? A mon avis, une voie possible d'approche, que je ne me risque pas sans hésitation à formuler, serait la suivante. Au cours de mes essais de localisations des phosphatases dans l'œuf et dans les constituants testiculaires des Mammifères, j'ai constaté, sans l'avoir délibérément cherché, qu'une lésion du plasmolemme provoque une activation locale rapide et intense de certaines phosphatases. On peut se demander s'il n'en irait pas ainsi pour la piqûre de l'œuf et si la lyse corticale n'aurait pas aussi cet effet lésionnel. Les techniques de détection cytochimique dont on dispose aujourd'hui permettraient probablement de s'en informer assez facilement sur les œufs d'Oursin. Pour ceux des Amphibiens, l'abord du problème serait plus délicat, en raison de leurs membranes, mais cet obstacle ne semble pas insurmontable. On pourrait encore suggérer de reprendre l'expérience de Bataillon relative à la régulation chromosomiale chez les Oursins et cela d'autant plus que le contrôle de ce phénomène serait particulièrement utile dans le cas des Mammifères.

Conclusion.

La parthénogénèse expérimentale a été et reste un des grands thèmes de la Biologie animale. Après avoir eu surtout pour objectif de montrer que des manipulations adéquates pouvaient être substituées à l'intervention du spermatozoïde, elle est devenue un puissant moyen d'analyse des processus initiateurs du développement embryonnaire, événements d'une importance plus qu'évidente. Bénéficiant des possibilités inhérentes à la Biologie moléculaire, les investigations sur la parthénogénèse ont déjà jeté une vive lumière sur ce domaine passionnant. Des voies pleines de promesses sont aujourd'hui ouvertes aux chercheurs, qu'il s'agisse de surmonter les difficultés techniques

que présentent encore les Mammifères, ou de comprendre le mécanisme de la synthèse protéique dans les œufs marins privés de leur noyau, ou de vérifier le rôle attribué aux microtubules, ou encore de définir certaines des activités enzymatiques sous-jacentes au dynamisme ovulaire. Ceux d'entre mes auditeurs les plus jeunes qui se souviendraient de ces « Considérations prospectives » vers l'an 2000 pourraient apprécier si elles ont eu quelque valeur!

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- BATAILLON, E., 1955. — Une enquête de trente-cinq ans sur la génération : 1900-1935. Préface et glossaire de J. Rostand. Collection « Esprit et Méthode ». Ed. Sedes, Paris.
- BRACHET, J., 1971. — La régulation de l'activité génétique pendant les premiers stades du développement. Chap. III (p. 37-78) de « La synthèse des ARN et son rôle dans le développement primitif et la différenciation de l'Embryon. » Cours et documents de Biologie, vol. 2. Edit. Et. Wolff, Paris ; Gordon et Breach.
- DALCQ, A.M., 1964. — Le Centrosome. *Bull. Cl. Sc., Ac. Roy. Belgique*, 5^e série, 50, pp. 1408-1449.
- DALCQ, A.M., 1972. — La Parthénogénèse expérimentale. *Encyclopaedia Universalis*, pp. 560-564.
- DIRKSEN, R.E., 1961. — The presence of centrioles in artificially activated sea urchin eggs. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 11, pp. 244-247.
- DUSTIN, P., 1972. — Les microtubules et leurs fonctions. *Bull. Ac. Roy. Médecine Belgique*, VII^e série, 12 : sous presse.
- FRASER, L.R., 1971. — Physico-chemical properties of an agent that induces parthenogenesis in *Rana pipiens* eggs. *J. exp. Zool.*, 177, pp. 153-172.
- GRAHAM, C.F., 1970. — Experimental early Parthenogenesis in Mammals. 6th Schering Symposium : Intrinsic and Extrinsic Factors in Early Mammalian Development, pp. 87-100, éd. G. Raspé, Pergamon Press and Vieweg.
- ROSTAND, J., 1950. — La Parthénogénèse animale. Nouvelle Collection scientifique. Edit. Les Presses Universitaires de France, Paris.
- SHAVER, J.R., 1953. — Studies on the initiation of cleavage in the frog egg. *J. exp. Zool.*, 122, pp. 169-192.
- TARKOWSKI, A.K., 1971. — Recent studies on parthenogenesis in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 14, pp. 31-39.