

COMPTES RENDUS
HEBDOMADAIRES
DES SÉANCES
DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES

PUBLIÉS
CONFORMÉMENT A UNE DÉCISION DE L'ACADÉMIE

EN DATE DU 13 JUILLET 1835

PAR MM. LES SECRÉTAIRES PERPÉTUELS

AVEC LE CONCOURS
DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

TOME DEUX CENT SOIXANTE-TROISIÈME

SÉRIE D : SCIENCES NATURELLES

TROISIÈME PARTIE : NOVEMBRE-DÉCEMBRE 1966

TABLES SEMESTRIELLES

PARIS
GAUTHIER-VILLARS ÉDITEUR
1966

EMBRYOLOGIE. — *Données préliminaires sur la détection histochimique des phosphatases dans les ébauches des membres de l'Orvet (Anguis fragilis L.) et du Lézard vert (Lacerta viridis Laur.).* Note (*) de M. ALBERT RAYNAUD et Mme JEANNE RAYNAUD (1), présentée par M. Jacques Tréfouël.

Les ébauches des membres qui se forment chez l'embryon d'Orvet n'ont qu'une existence temporaire : après une courte période de développement, elles cessent de croître, puis régressent [(2), (3)]; les cellules ectodermiques situées au sommet de l'ébauche dégénèrent précocement (4); cette dégénérescence doit constituer un des facteurs essentiels intervenant dans l'arrêt du développement du membre.

Ces particularités du développement nous ont conduits à entreprendre une étude comparative du développement des ébauches des membres de l'Orvet et de celles d'un autre Lacertien (ici, le Lézard vert) pourvu de membres à l'état adulte. L'étude histologique, puis l'étude histochimique de la répartition des substances PAS positives et des ribonucléines dans les ébauches des membres de ces deux espèces ont été abordées (5). Les travaux de Milaire [(6), (7), (8)] ayant montré l'intérêt, dans l'embryologie des membres des Mammifères, de l'étude de la répartition des phosphatases (détectées histochimiquement) dans ces ébauches, nous avons cherché à mettre en évidence ces enzymes, dans les ébauches des membres de l'Orvet et du Lézard vert; ce sont les premiers résultats de cette étude que nous résumons ici.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — Les embryons d'Orvet proviennent d'Orvets gravides récemment capturés ou élevés dans des terrariums; après anesthésie de la mère à l'éther, les œufs sont extraits des oviductes, les embryons prélevés et immergés dans le fixateur approprié; une quinzaine d'embryons, appartenant à trois portées ont été utilisés pour ces recherches; les plus jeunes mesuraient 5,5 mm de longueur (leur allantoïde atteignait 2 à 4 mm de longueur); les ébauches des membres postérieurs formaient de simples renflements sur les bords latéraux du cloaque, les ébauches des membres antérieurs étaient saillantes [voir (3)]; chez les embryons mesurant de 5,5 à 6,5 mm (l'allantoïde, de 4 à 5 mm de longueur, recouvrait la tête et débordait du côté ventral) les ébauches des membres postérieurs étaient devenues saillantes; celles des membres antérieurs avaient déjà un peu régressé. Les embryons de Lézard vert proviennent de pontes obtenues au laboratoire et incubées, sur coton humide, à 25-26°C; les embryons étudiés possédaient des ébauches de membres atteignant 1 à 1,5 mm de longueur. La détection histochimique des phosphatases a été réalisée selon les techniques mises au point par Milaire [voir (8)], et auxquelles il a bien voulu nous initier; nous n'indiquerons ici que les étapes essentielles de ces réactions.

Phosphatase alcaline : Fixation des embryons dans l'alcool absolu à une température de + 2 à + 5°C; déshydratation, imprégnation rapide au benzol, inclusion dans la paraffine à 55°; coupes à 10 μ qu'on incube à 37° à la surface du milieu d'incubation (glycérophosphate de sodium tamponné avec du véronal sodique à 0,4 %, MgCl₂ à 0,04 %; pH 9,2); la durée d'incubation fut comprise entre 3 à 12 h et fut en général de 4 à 5 h. Le précipité de phosphate tricalcique formé aux emplacements occupés par l'enzyme est révélé, sur les coupes paraffinées flottantes, par la méthode au nitrate d'argent et l'exposition aux rayons ultraviolets.

Pour la *phosphatase acide* le milieu d'incubation était constitué par du glycérophosphate de sodium additionné d'une solution tampon donnant un pH égal à 5; la durée d'incubation varia de 12 à 15 h; le phosphate de sodium libéré par l'enzyme forme du phosphate de plomb qui est révélé par la technique de Gomori au sulfure d'ammonium.

Pour les *phosphohydrolases* recherchées, la solution tampon utilisée dans la préparation du bain d'incubation fut du type « Tris-maléate »; la révélation et la suite des opérations s'effectuent selon la méthode utilisée pour la phosphatase acide.

RÉSULTATS OBTENUS. — 1. PHOSPHATASE ALCALINE. — *Embryons d'Orvet*. — Dans les ébauches des membres aux stades de jeunes renflements (ici, notre étude a porté sur les ébauches des membres postérieurs), nous n'avons pas observé de phosphatase alcaline dans les cellules provenant de la prolifération mésodermique pariétoleurale, ni dans l'épiblaste qui la recouvre. A un stade un peu plus avancé (membres postérieurs des embryons de 6 mm de longueur), une activité phosphatasique alcaline modérée est présente dans les assises cellulaires basales de l'ébauche du membre; elle fait défaut dans les cellules mésoblastiques formant le corps principal de l'ébauché et dans l'épiblaste (*fig. 1*). Lorsque l'ébauche du membre est devenue saillante, à extrémité pointue (ici, nos observations

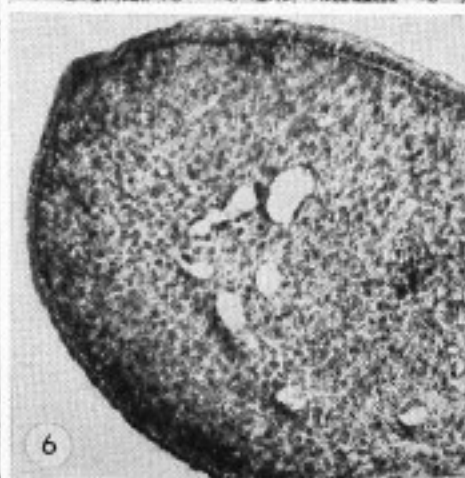
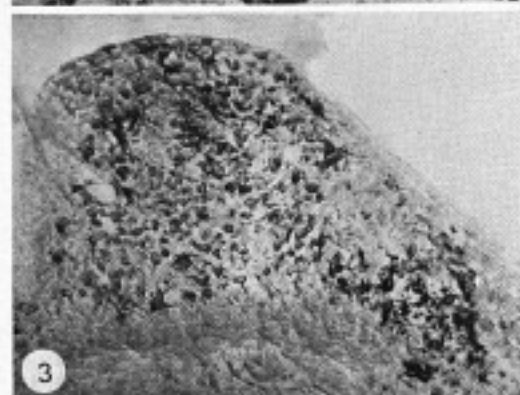
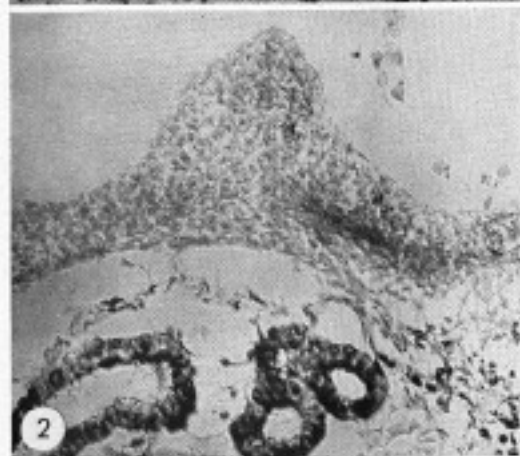
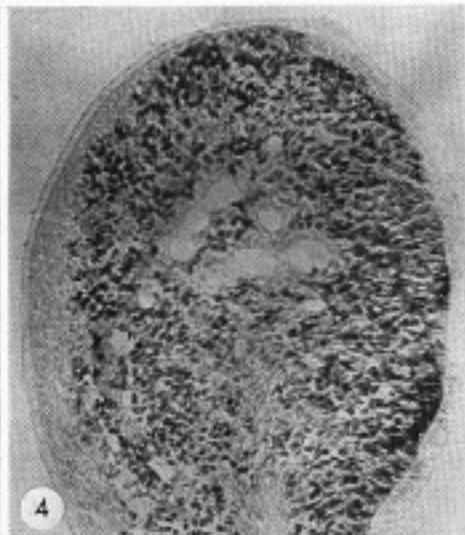
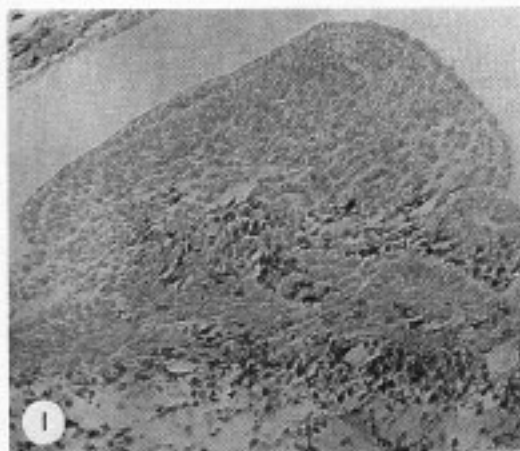
EXPLICATION DE LA PLANCHE.

Activités phosphatasiques dans les ébauches des membres de l'Orvet et du Lézard vert.

Fig. 1 à 3. — Activité phosphatasique alcaline chez l'embryon d'Orvet (1, membre postérieur d'un embryon de 6,5 mm; 2 et 3, membres antérieurs d'un embryon de 5 mm et de 6 mm de longueur).

Fig. 4. — Membre antérieur d'un embryon de *Lacerta viridis* de 5,8 mm de longueur; phosphatase alcaline.

Fig. 5 et 6. — Activité phosphatasique acide dans l'ébauche d'un membre antérieur d'un embryon d'Orvet de 6 mm (*fig. 5*) et d'un embryon de Lézard vert de 5,8 mm de longueur (*fig. 6*).



portent sur les membres antérieurs) on n'observe qu'une faible activité phosphatasique alcaline dans la partie mésodermique de l'ébauche (*fig. 2*) : de fins dépôts d'argent existent au niveau des membranes cellulaires et à la base de l'ébauche, dans le tissu prolongeant le dermatome; l'épiblaste est légèrement épaissi au sommet de l'ébauche du membre mais dépourvu, là, et sur toute la surface de l'ébauche, d'activité phosphatasique (il y en a cependant des traces dans sa membrane basale).

Lorsque l'ébauche du membre a atteint son maximum de développement et que son extrémité distale est arrondie, l'activité phosphatasique alcaline a fortement augmenté dans ses tissus : chez les embryons de 6 à 6,5 mm de longueur, la majorité des cellules mésodermiques de l'ébauche présentent (*fig. 3*) une activité enzymatique assez intense, à la fois autour du noyau et dans les cytoplasmes; toutefois, il n'y a pas d'activité enzymatique dans une bande de cellules mésoblastiques sous-jacente à l'épiblaste sur le bord dorsal de l'ébauche, dans la région préaxiale et également dans une petite zone bordante, post-axiale et dans une bande transversale sub-terminale. Les cellules épiblastiques au sommet de l'ébauche du membre montrent également une activité enzymatique nucléaire et cytoplasmique mais son intensité ne dépasse pas celle du mésoblaste : on n'observe pas une accumulation particulière à ce niveau, comme cela se produit à des stades de développement comparable (et dans les stades précédents la différenciation morphologique de la crête apicale), chez l'embryon de Taupe ou de Souris [voir Milairé, 1963 (1)].

Embryons de Lacerta viridis. — Les embryons de Lézard vert dont nous avons pu disposer pour cette étude possédaient des ébauches de membres atteignant de 1 à 1,5 mm de longueur. Une activité phosphatasique alcaline assez intense est présente dans le mésoblaste (sa répartition topographique sera précisée dans un autre travail : on observe en effet un champ dorsal et certaines zones dans lesquels l'activité est faible ou nulle); mais nous n'avons pas trouvé d'activité dans l'épiblaste ni dans la crête apicale (*fig. 4*).

2. PHOSPHATASE ACIDE. — *Embryons d'Orvet.* — Dans les ébauches de membre n'ayant pas atteint leur développement maximal, une activité phosphatasique acide modérée s'observe dans le mésoblaste, particulièrement dans une zone subapicale; il y en a seulement des traces dans l'épiblaste. Lorsque l'ébauche a atteint sa taille maximale, une activité phosphatasique acide assez forte, s'observe dans toute l'ébauche, avec une intensité particulière dans l'épiblaste apical et ventral et dans le mésenchyme axial (*fig. 5*).

Embryons de Lacerta viridis. — Chez les embryons étudiés (ébauche du membre antérieur atteignant 1 à 1,2 mm de longueur, ébauche du membre postérieur de 0,8 mm) une activité phosphatasique acide est présente (*fig. 6*) dans l'épiblaste, dans la crête apicale et dans le mésoblaste; dans ce dernier, sa répartition n'est pas homogène; l'activité est plus intense dans les

cellules mésoblastiques sous-épidermiques et particulièrement sur le bord dorsal du membre (là où l'activité phosphatasique alcaline était absente).

3. PHOSPHOHYDROLASES. — La réaction observée dans les ébauches de membres de l'Orvet, au voisinage de leur développement maximal, après l'emploi des mononucléotides monophosphatés utilisés, varie avec ces derniers : après incubation en présence d'AMP (adénosine-5'-monophosphate de sodium), on n'observe que des traces d'activité enzymatique dans l'épiblaste ventral et dans le mésoblaste; après emploi d'ATP (adénosine-5'-triphosphate de sodium), on note une activité enzymatique intense dans tout l'épiblaste recouvrant le membre, une activité faible dans le mésoblaste (mais plus marquée dans la région distale et axiale).

Ainsi, les observations que nous avons effectuées sur les activités phosphatasiques des ébauches des membres des Reptiles diffèrent sur de nombreux points de celles ayant trait aux membres des embryons de Mammifères [(⁶), (⁷), (⁸)]; en particulier la pauvreté en phosphatase alcaline de l'ébauche du membre de l'Orvet aux premiers stades de son développement, l'absence de cette enzyme dans le mésoblaste et dans l'épiblaste de la région apicale, à ces stades, est sans doute à mettre en rapport — si la fixation et la méthode utilisées ont traduit fidèlement la localisation de l'enzyme — avec l'absence d'une différenciation nette d'une « crête apicale » chez l'embryon d'Orvet et peut-être aussi avec la dégénérescence précoce que subiront les cellules épiblastiques constituant l'ébauche de cette crête. Les observations relatives à l'embryon de *Lacerta viridis* posent d'autres problèmes. De nouvelles recherches vont être entreprises sur ce point et pour compléter nos premières observations.

(*) Séance du 2 novembre 1966.

(¹) Avec l'assistance technique de M^{lle} M.-C. Lefebvre.

(²) G. BORN, *Zool. Anz.*, 6, 1883, p. 537-539.

(³) A. RAYNAUD, *Comptes rendus*, 254, 1962, p. 3449.

(⁴) A. RAYNAUD, *Comptes rendus*, 254, 1962, p. 4505; *Bull. Soc. zool. Fr.*, 88, 1963, p. 299-324.

(⁵) A. RAYNAUD et J. RAYNAUD, *Comptes rendus*, 257, 1963, p. 2886.

(⁶) J. MILAIRE, *Bull. Acad. Med. Belg.*, Cl. Sci., 5^e série, 48, 1962, p. 505-528.

(⁷) J. MILAIRE, *Arch. Biol.*, 1963, 74, p. 129-317.

(⁸) J. MILAIRE, *Acad. Roy. Belg.*, Cl. Sci., 16, 1965, p. 1-119.

(Service d'Embryologie expérimentale de l'Institut Pasteur,
20, rue des Moulins, Sannois, Val-d'Oise.)