
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ANNA F. VALENTINI, NADIR MARALDI

**Observations sur la structure submicroscopique de
l'ébauche du coeur pendant l'évolution primitive de
son activité contractile dans l'embryon de poulet**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 48 (1970), n.2, p. 270–276.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_2_270_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_2_270_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Citologia. — *Observations sur la structure submicroscopique de l'ébauche du coeur pendant l'évolution primitive de son activité contractile dans l'embryon de poulet* (*). Nota di ANNA F. VALENTINI e NADIR MARALDI, presentata (**) dal Socio O. M. OLIVO.

RIASSUNTO. — Vengono studiati, nell'abbozzo precoce del cuore embrionale di pollo, gli stadi di sviluppo immediatamente precedenti e susseguenti l'inizio dell'attività contrattile, per determinare con precisione quale sia il substrato morfologico delle prime contrazioni di tipo peristaltico.

Nell'abbozzo cardiaco nel quale non si sia ancora manifestata l'attività contrattile, sono presenti filamenti dispersi, ondulati e a diverso orientamento.

All'insorgere delle prime contrazioni, si osservano nel citoplasma dei mioblasti, gruppi di miofilamenti ondulati, riuniti in fascetti, disposti parallelamente fra loro. Alcuni si ancorano ai plasmalemmi in corrispondenza dei desmosomi.

I dati raccolti sul carattere morfologico delle strutture presenti durante la primissima attività contrattile del tubo cardiaco, ci permettono di sostenerne la diversità rispetto alle strutture responsabili della contrazione cardiaca tipica.

Questa affermazione sarebbe confermata a quanto è stato osservato a proposito della risposta all'azione del CaCl_2 e dei rilievi elettrocardiografici: i tracciati registrati nel periodo dell'attività contrattile iniziale sono tipici di una contrazione a carattere peristaltico.

Les études sur l'ébauche du coeur de l'embryon de poulet ont désormais éclairci depuis quelque temps les rapports qui existent entre le substrat morphologique spécifique et la fonction correspondante, c'est-à-dire l'activité contractile typique du myocarde.

L'emploi de techniques de plus en plus adéquates, et surtout de la microscopie électronique, a permis de décrire en détail les caractères de la structure myofibrillaire, en précisant plusieurs points précédemment controversés [1, 2, 3, 7].

Dans ce travail nous avons essayé de déterminer le substrat morphologique correspondant non pas tellement à l'activité contractile typique du coeur, mais plutôt au début de cette contractilité, qui a ses propres caractères particuliers. Nous avons donc essayé de déterminer s'il y a ou non des structures filamenteuses déjà bien ordonnées, ou si l'activité initiale de contraction se rapporte à des structures de ordre de grandeur moléculaire qui ne sont pas démontrables aujourd'hui, du point de vue morphologique.

Plusieurs facteurs nous ont adressé dans cette direction:

1) l'observation au microscope optique d'une activité contractile initiale spéciale du type « péristaltique » [5];

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Umana Normale e al Centro di Microscopia Elettronica dell'Università di Bologna con finanziamento del C.N.R. (Contratto 115/1070/1341).

(**) Nella seduta del 14 febbraio 1970.

2) l'observation au microscope électronique de myofilaments ondulés dispersés dans le cytoplasme, aux stades de 7-9 somites [7];

3) de tracés électrocardiographiques [6] qui ont démontré qu'une onde monophasée lente correspond à l'activité contractile précoce et au contraire, à l'activité contractile plus avancée (12-13 somites) correspond un tracé où un « spike » se superpose à l'onde monophasique (ce qui est peut-être un signe de l'apparition de myofibrilles) jusqu'à obtenir un électrocardiogramme typique au 3^e-4^e jour de développement (figs. 1, 2 et 3).

4) la réponse à l'action du CaCl_2 [4]. En effet la fibrillation ne se produit qu'aux stades de 10-11 somites (ce qui indique, selon l'Auteur l'absence de myofibrilles); au contraire, la fibrillation se produit si le nombre des somites augmente, 11-12 et suivants (ce qui indiquerait la présence de myofibrilles).

MATERIELS ET METHODES.

Nous avons étudié du matériel sûrement non contractile: 7-8 somites; aux limites de la contraction: 8-9 somites; et au début de l'activité contractile: 9 somites. Nous pouvons rapporter ces données avec un degré assez élevé de certitude d'après une étude systématique faite en observant constamment l'ébauche du coeur pour déterminer les stades qui précèdent immédiatement l'activité contractile, ceux qui sont à la limite entre non-contraction et contraction, et ceux qui sont déjà pulsatifs.

Nous avons aussi isolé des blastoderms à 6 somites de développement, les conservant dans un thermostat à 37° C pour faire continuer la maturation. L'observation constante au microscope optique, toujours à 37° C de température, nous a permis de déterminer l'apparition de l'activité contractile.

On a utilisé des coeurs d'embryon de poulet de 6 à 13 somites de développement, stades 4-6 selon la classification de Hamburger et de Hamilton. Le matériel utilisé était compris entre la 30^e et la 40^e heure d'incubation à 38° C.

Les blastoderms prélevés étaient plongés dans le fixateur choisi, pour procéder ensuite à l'isolement complet du tube cardiaque du reste de l'embryon et des membranes, à l'aide d'un « Gräfe » et d'une aiguille de dissection.

Au contraire les blastoderms, dont on a suivi le développement au microscope, à 37° C de température, ont été étendus sur une plaque de mica et fixés à cette dernière avec une goutte de plasma sanguin et d'extrait embryonal, et ensuite montés sur un porte-objets creux. Lorsqu'on atteignait le stade voulu, on plongeait le porte-objets dans le fixateur et l'on procédait à l'isolement du tube cardiaque de la façon habituelle. Les tubes cardiaques isolés ont été fixés de deux manières différentes:

a) pré-fixation au glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon de phosphates 0,1 M et post-fixation au tétroxyde d'osmium à 1 % dans le même tampon.

b) fixation au tétroxyde d'osmium à 1 % en tampon de phosphates 0,1 M.

Nous avons remarqué que la deuxième modalité de fixation permet une visualisation meilleure du matériel myofilaenteux dans une matrice cytoplasmatique moins dense; par conséquent elle a été utilisée presque constamment. Après la déshydratation le matériel a été imprégné en Acétate d'Uranyle à 0,2 % en alcool absolu et ensuite inclus dans l'Epon 812. Les coupes ont été réalisées à l'aide de l'ultramicrotome Reichert OM U 2 et les observations ont été effectuées au microscope Siemens Elmiskop I.

RESULTATS.

Le tube cardiaque au stade de 7 somites, jamais pulsatif, apparaît constitué par une couche monocellulaire de myoblastes qui ont des connexions assez labiles les uns avec les autres, avec de larges lacunes entre cellule et cellule lacunes qui sont peut-être accentuées ou déterminées par la fixation. Dans les points de contact les membranes plasmatiques ne présentent pas de spéciales différenciations du type des desmosomes. Les myoblastes avec leur axe majeur sont en position perpendiculaire par rapport à l'axe de l'ébauche du coeur. Leur cytoplasme est riche en vacuoles et en gouttes de lipides (Pl. I, fig. *a*). La matrice cytoplasmatique est assez claire. D'amples zones de cytoplasme présentent de nombreux myofilaments dispersés, sinueux, ayant une épaisseur d'environ 50 Å, et une orientation variée, et qui seulement dans quelques cas se présentent groupés en petits faisceaux parallèles (Pl. I, fig. *b* et *c*). Il n'est pas pratiquement possible d'en préciser la longueur. Les mitochondries présentent une matrice assez dense et des crêtes bien développées. Dans presque tous les myoblastes on peut observer un appareil de Golgi et des corps multivésiculaires (Pl. I, fig. *b* et *c*). Le glycogène n'est pas très abondant et se présente distribué d'une manière uniforme sous forme de particules dispersées dans tout le cytoplasme. Les ribosomes libres sont peu nombreux de même que les éléments du réticulum endoplasmique.

Dans le noyau nous avons relevé un détail structural particulier, consistant en cisternes apparemment délimitées par des membranes qui présentent des formes variées, arrondies, avoïdes ou irrégulièrement aplaties (Pl. I, fig. *a* et Pl. II, fig. *a*). Ces cavités sont costamment à proximité du constituant granulaire du nucléole.

Dans les myoblastes de l'ébauche du coeur de l'embryon de poulet à 8 somites de développement, toujours non pulsative, l'aspect cytoplasmique est presque semblable à celui de 7 somites. Le nombre des myofilaments dispersés a augmenté, mais les modalités d'agrégation de ces derniers restent fortuites, sans une précise orientation spatiale (Pl. II, fig. *b*). Les petites masses de glycogène ont augmenté soit en nombre qu'en dimension (Pl. II, fig. *b*). Les membranes plasmatiques dans les points de contact ne présentent pas encore des différenciations du type des desmosomes. Les dimensions des appareils de Golgi sont augmentées, de même que le nombre des corps multivésiculaires.

Au stade de 9 somites, les ébauches du coeur sont pulsatives. Les contacts entre les membranes plasmatique contigues se sont faits plus étroits et plusieurs desmosomes sont apparus (Pl. IV, fig. *a*). Les ribosomes libres et les polyribosomes sont très nombreux (Pl. III, fig. *a*). Les particules de glycogène tendent à confluer en amas (Pl. III, fig. *a* et *b*). Le cytoplasme des myoblastes à ce stade n'est pas seulement riche en petits faisceaux de myofilaments ondulés (Pl. IV, fig. *a*), mais présente aussi des myofilaments ayant un rangement parallèle toujours réunis en petits faisceaux, qui s'insèrent sur les membranes plasmatiques en correspondance de desmosomes et s'infléchissent ensuite pour se ranger parallèlement à la membrane (Pl. IV, fig. *b*). En tout cas on ne relève pas de lignes Z le long des faisceaux de myofilaments.

Au stade de 10-11 somites, les structures submicroscopiques intracellulaires se présentent plus différenciées: la plupart des myofilaments n'a plus un rangement ondulé, mais rectiligne et dans quelques cas on peut relever la présence de sarcomères qui vont assumer le rangement définitif, avec la présence de filaments gros et minces, groupés dans des zones distinctes. Les premières stries Z (Pl. V, fig. *a*) se présentent régulièrement distancées les unes des autres d'environ $1\ \mu$ et parfois on commence à distinguer la ligne M. La matrice cytoplasmique s'est épaissie, de larges morceaux de glycogène occupent les espaces entre les myofibrilles et les rapports entre les membranes des myoblastes se sont faits plus étroits.

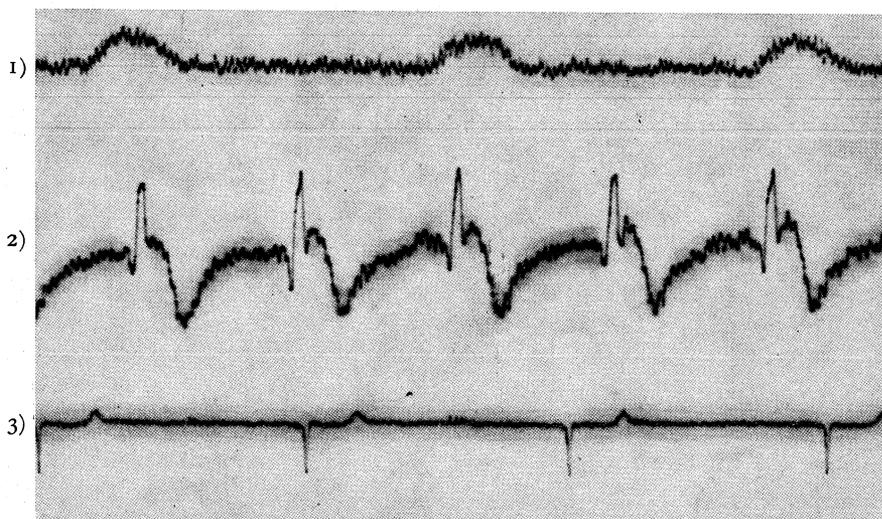
Au stade de 13 somites, les myofibrilles ont augmenté leur longueur, avec les stries Z régulièrement distancées les unes des autres, et se disposent parallèlement et en contact étroit au moins avec une part de la membrane plasmatique du myoblaste. Les disques intercalaires se présentent dans leur structure presque définitive. Le noyau des myoblastes présente encore des cysternes du même type décrit dans les stades précédents, en corrélation étroite avec le constituant granulaire du nucléole (Pl. V, fig. *b*).

DISCUSSION.

D'après les données relevées, nous pensons que l'activité contractile initiale de type péristaltique se rapporte à la situation morphologique particulier observé à 9 somites, qui est représenté par l'accrochage des myofilaments aux desmosomes des plasmalemmes. A notre avis, les myofilaments dispersés et libres ne peuvent pas être considérés responsables de l'activité contractile; car, même s'ils se contractaient, n'auraient pas une efficacité mécanique, en tenant compte surtout de la fluidité cytoplasmique des myoblastes. Nous n'avons pas trouvé de myofibrilles à ce stade de développement, contrairement à ce que soutient Lidner [3]; en outre, la contraction cardiaque apparaît avant de la formation des premières lignes Z, contrairement à ce que soutient Hibbs [1]. L'activité contractile initiale est du type péristaltique (fig. 1) car les myofilaments ancrés aux desmosomes ne présentent pas une structure périodique évidente; donc se répètent les conditions existant dans la muscu-

lature lisse. Ces myofilaments, ainsi insérés, ont en outre une efficacité contractile, car lorsqu'ils se contractent, étant attachés à les membranes plasmiques, ils provoquent une déformation de la cellule. Etant donné que l'activité initiale est précisément péristaltique, il n'est pas nécessaire de penser à des dispositifs particuliers pour la transmission de l'excitament, car on sait bien qu'il y a (au moins pour les musculatures lisses) une forte sensibilité aux stimulus mécaniques, qui sont suffisants à diffuser l'excitement.

On n'a pas pu éclaircir l'orientation réelle des myofilaments par rapport aux axes du tube cardiaque, mais si nous admettons que l'orientation prédominante des filaments est située dans le plan tangentiel aux parois du tube



Figs. 1-3. - Tracés électrocardiographiques d'ébauches cardiaques à des stades différents de développement.

1) E.c.g. de l'ébauche du coeur d'embryon de poulet au stade de 9 somites. On peut remarquer un tracé caractérisé par une onde monophasique lente, du type de la musculature lisse; 2) E.c.g. de l'ébauche du coeur d'embryon de poulet au stade de 12-13 somites. A l'onde monophasique s'ajoute un « spike » poliphase; 3) E.c.g. de l'ébauche du coeur d'embryon de poulet à 3 jours d'incubation. E.c.g. typique avec des complexes rapides suivis par l'onde « t ».

cardique, il n'est plus important que leur rangement soit rectiligne et avec une direction prédominante dans le plan. En effet, même avec une disposition à réseau ou un rangement arqué, leur raccourcissement global ne peut que déterminer une diminution de superficie, n'importe si en direction longitudinale ou transversale, car le résultat devra toujours déterminer à un certain niveau un rétrécissement de la lumière du tube cardiaque.

La zone d'accrochage des myofilaments aux desmosomes des membranes plasmiques est symétrique et bilatérale et constitue déjà la connexion caractéristique des disques intercalaires, bien que l'aspect morphologique ne soit pas encore complet.

A 12-13 somites de développement l'activité est encore péristaltique, mais plus rapide, et le tracé électrocardiographique montre quelques « spi-

kes » (fig. 2). Donc persistent les dispositifs qui étaient responsables de l'activité péristaltique lente des 9 somites, mais, avec l'apparition des myofibrilles, la vitesse de conduction des stimulus augmente considérablement. Les myofibrilles avec leur activité seraient aussi responsables du « spike ».

A 13 somites de développement prévaut la structure spécifique myofibrillaire; donc son activité est dominante: la fréquence des contractions et la vitesse de propagation de l'excitement augmentent ultérieurement (fig. 3).

Les particulières structures à cisterne que nous avons décrites dans le noyau peuvent peut-être se rapporter à des structures semblables, mais bien plus complexes, décrites par Terzakis dans les cellules de l'endomètre humain [8]; de ces dernières on ne peut pas pour l'instant donner une interprétation fonctionnelle.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] HIBBS R. G., *Electron microscopy of developing cardiac muscle in chick embryos*, « Am J. Anat. », 99, 17-51 (1956).
- [2] HUXLEY H. E., *Muscle cells from "Toll Cell"*, Vol. IV, 365-481. Ed. J. Brachet and A. E. Mirski 1960.
- [3] LINDNER E., *Myofibrills in the early development of chick embryos hearts as observed with electron microscope*, « Anat. Rec. », 136, 234-235 (1960).
- [4] OLIVO O. M., *Sulle modificazioni dell'attività contrattile del cuore di embrioni di pollo determinate dall'azione di sali di calcio e di potassio*, « Arch. Fisiol. », 22, 1-36 (1924).
- [5] OLIVO O. M., *Sull'inizio della funzione contrattile del cuore e dei mitotomi dell'embrione di pollo in rapporto alla loro differenziazione morfologica e strutturale*, « Arch. f. exper. Zellf. », 1, 427-500 (1925).
- [6] OLIVO O. M., PETRALIA S. et RICAMO R., *L'elettrocardiogramma dell'embrione di pollo nel periodo iniziale dell'attività contrattile cardiaca*, « Mem. Acc. Sc. Ist. Bologna », S X, T. 5, 41-50 (1947-48).
- [7] OLIVO O. M., LASCHI R. et LUCCHI M. L., *Genesi delle miofibrille del cuore embrionale di pollo osservate al microscopio elettronico e inizio dell'attività contrattile*, « Lo Sperim. », 114, 69-78 (1964).
- [8] TERZAKIS S. A., *The nucleolar channel system of human endometrium*, « J. Cell. Biol. », 27, 293-304 (1965).

EXPLICATION DES PLANCHES I-V

PLANCHE I.

Ebauche du coeur d'embryon de poulet au stade de 7 somites.

Fig. a - Le tube cardiaque est constitué par une couche monocellulaire de myoblastes qui présentent des connexions assez lâches. Dans le noyau d'un myoblaste, à côté du nucléole, quelques cisternes (flèches) sont présentes; $\times 7.500$.

Fig. b - Détail d'un myoblaste où plusieurs filaments dispersés et sinueux sont bien visibles. On peut voir aussi des éléments du réticulum endoplasmique et un corps multivésiculaire (cmv); $\times 32.500$.

Fig. c - Un groupe de myofilaments en rangement sinueux est situé près d'un appareil de Golgi (g); $\times 32.500$.

PLANCHE II.

- Fig. *a* – Dans les noyaux de deux myoblastes contigus d'une ébauche de coeur d'embryon de poulet au stade de 7 somites on peut remarquer deux cisternes situées en relation topographique étroite avec le constituant granulaire du nucléole (flèches); $\times 25.000$.
- Fig. *b* – Détail cytoplasmique d'un myoblaste d'embryon de poulet au stade de 8 somites où sont présents de petits amas de glycogène (*gl*) et une trame épaisse de myofilaments désordonnés; $\times 53.000$.

PLANCHE III.

Ebauche du coeur d'embryon de poulet au stade de 9 somites.

- Fig. *a* – Dans le cytoplasme de ce myoblaste sont visibles des ribosomes et polyribosomes (pr) en grand nombre et quelques amas de glycogène; $\times 38.000$.
- Fig. *b* – Le rangement des myofilaments, groupés en petits faisceaux, est parallèle à les membranes plasmiques de deux myoblastes contigus; $\times 45.000$.

PLANCHE IV.

Ebauche du coeur d'embryon de poulet au stade de 9 somites.

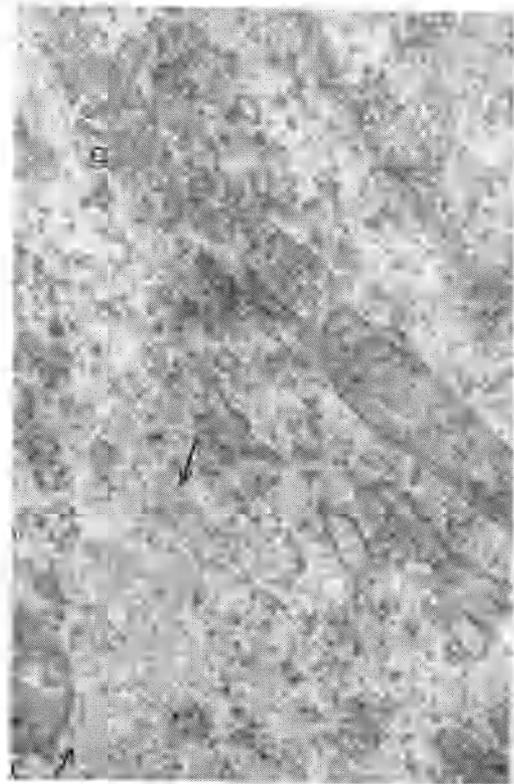
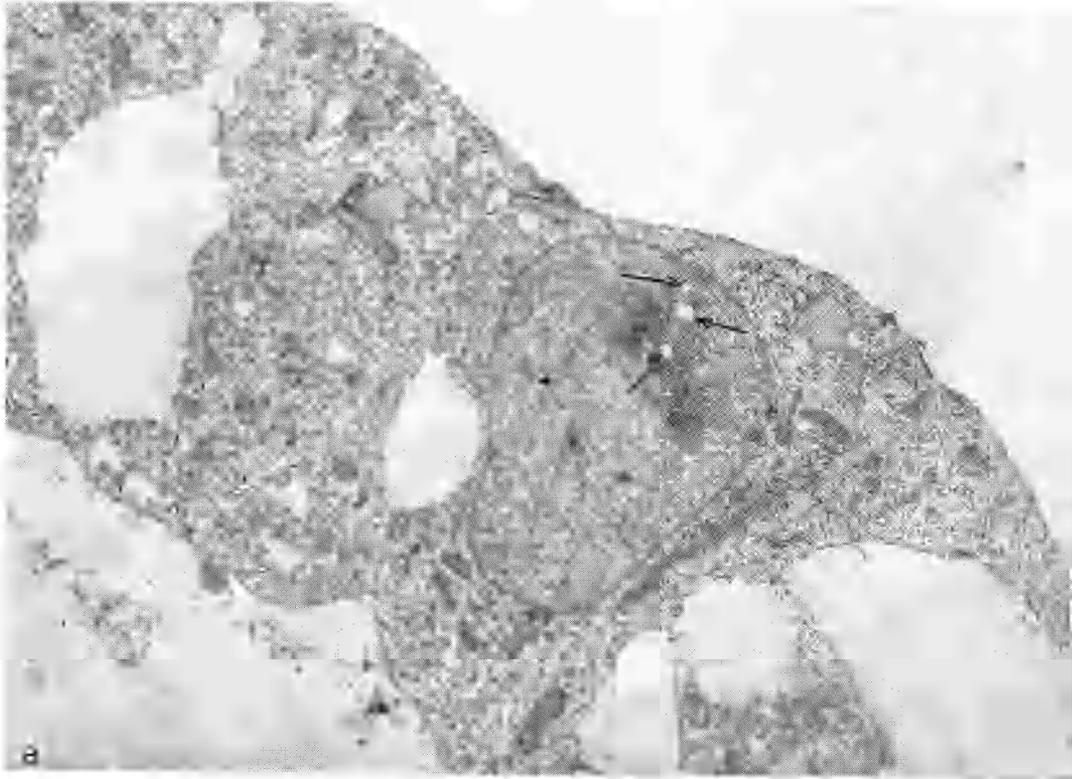
- Fig. *a* – Les membranes plasmiques des myoblastes présentent quelques épaisissements du type des desmosomes (*d*). Les myofilaments s'écoulent de préférence parallèles aux membranes; $\times 30.000$.
- Fig. *b* – De petits faisceaux de myofilaments en rangement parallèle s'insèrent sur les membranes à niveau d'un desmosome (flèches); $\times 33.000$.

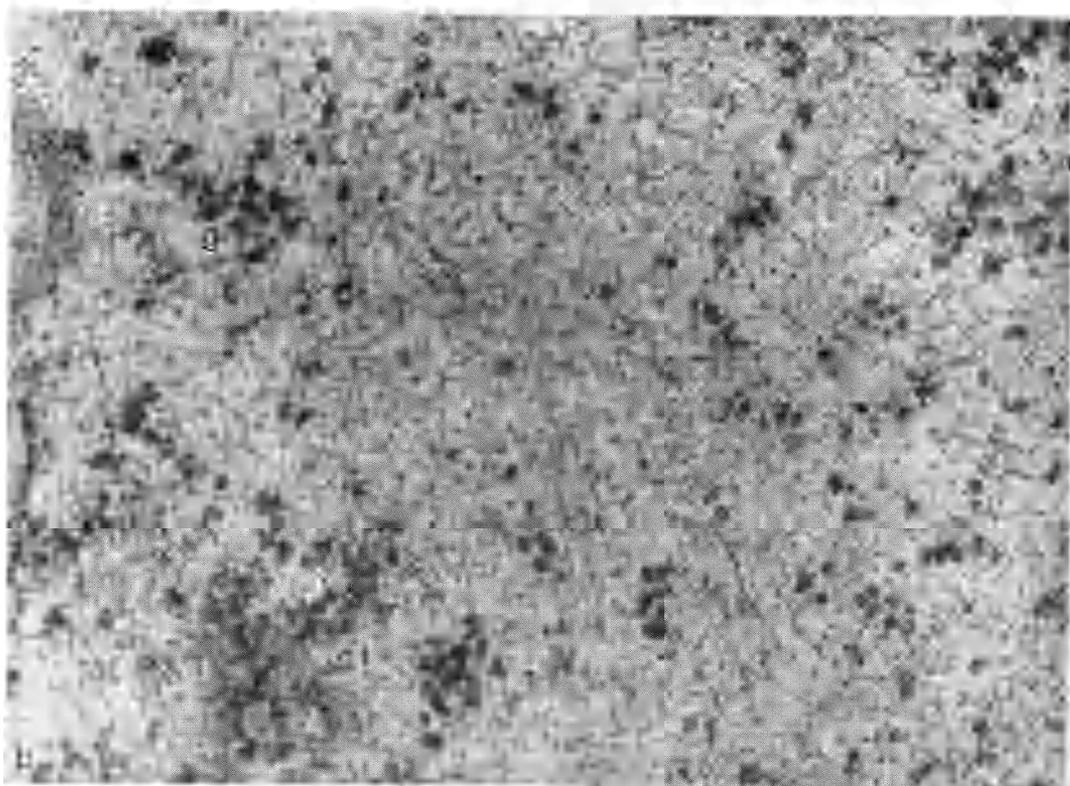
PLANCHE V.

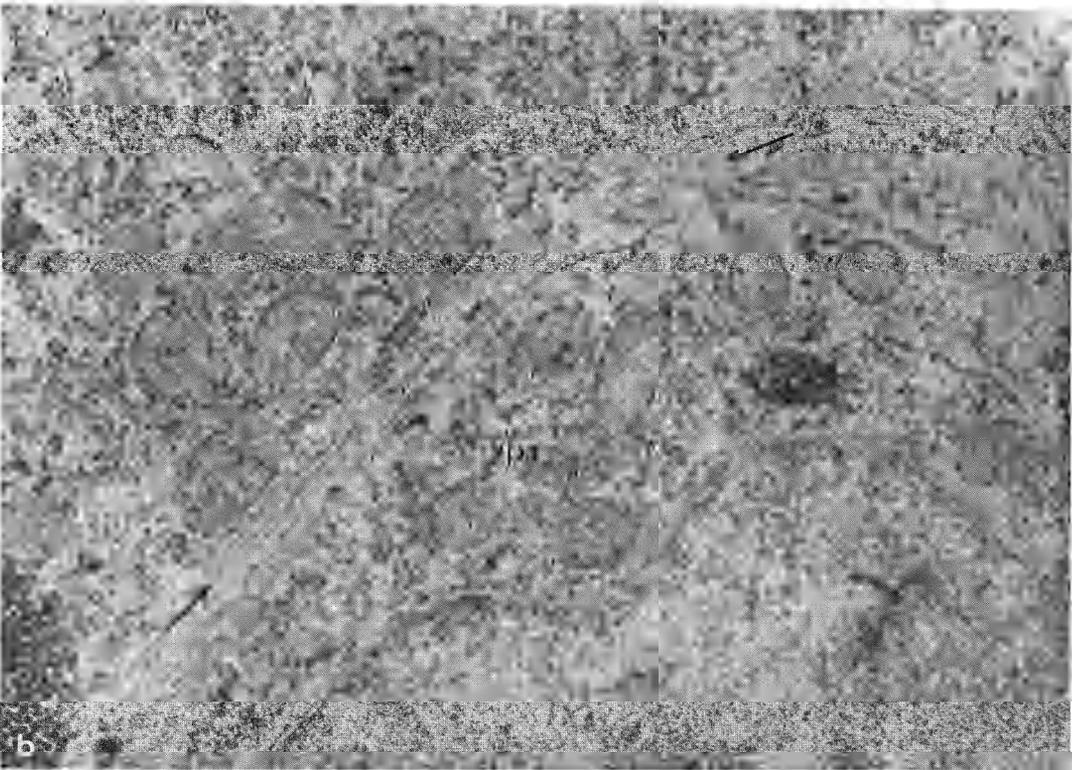
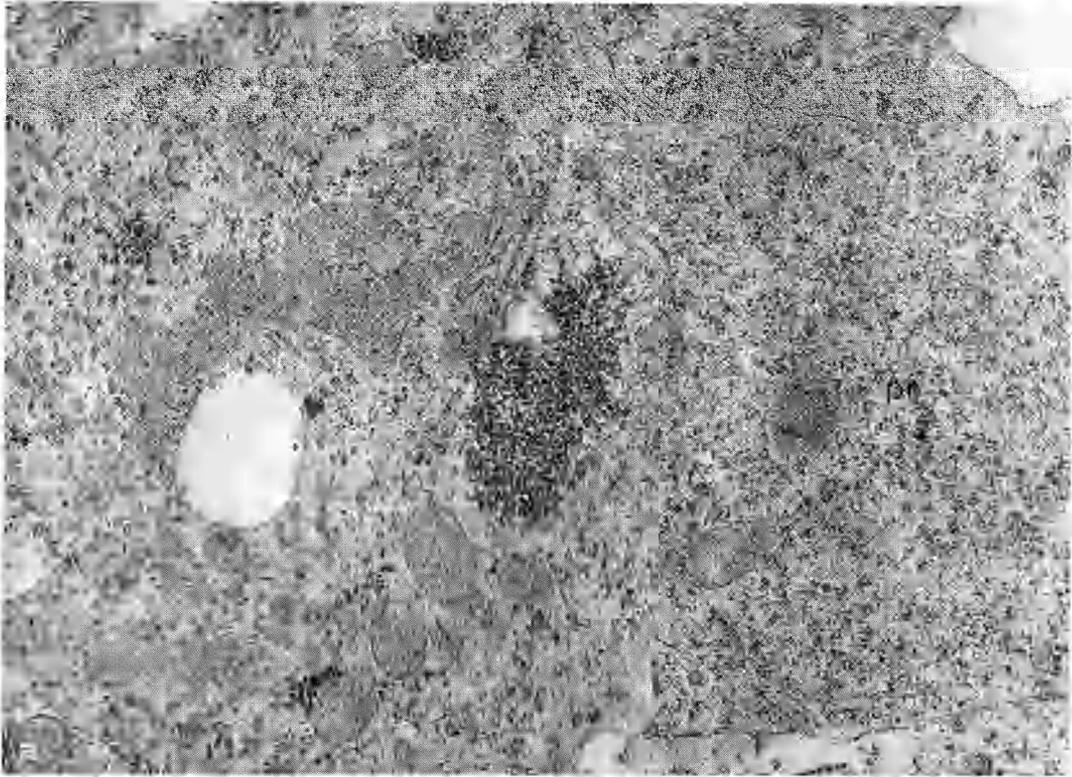
Fig. *a* – Ebauche du coeur d'embryon de poulet au stade de 10 somites.

Dans le cytoplasme de ce myoblaste on peut remarquer, à côté de plusieurs myofilaments dispersés, un sarcomère ou on peut déjà distinguer deux groupements de filaments d'épaisseur différent, et aussi une première strie Z (flèches); $\times 60.000$.

- Fig. *b* – Ebauche du coeur d'embryon de poulet au stade de 13 somites. A niveau d'un disc intercalaire (flèche) s'insèrent deux myofibrilles, dont une, qui coule parallèlement à la membrane du myoblaste, présente des stries Z régulièrement distancées les unes des autres. Dans le noyau des cisternes en relation avec le constituant granulaire du nucléole sont encore présentes; $\times 20.000$.







b

