
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

LOUIS GALLIEN, CLAUDE GALLIEN, CHRISTIAN AIMAR,
FRANÇOISE GUILLET

Substitution fonctionnelle de l'activité d'un noyau greffé au conditionnement initial de l'oeuf, dans l'hybridation nucléocytoplasmique entre *Pleurodeles waltlii* Mich. et *Pleurodeles poireti* Gervais (Amphibiens, Urodèles)

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 52 (1972), n.3, p. 406–411.
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_52_3_406_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/>

Embriologia sperimentale. — *Substitution fonctionnelle de l'activité d'un noyau greffé au conditionnement initial de l'oeuf, dans l'hybridation nucléocytoplasmique entre Pleurodeles waltlii Mich. et Pleurodeles poireti Gervais (Amphibiens, Urodèles).* Nota di LOUIS GALLIEN, CLAUDE GALLIEN, CHRISTIAN AIMAR e FRANÇOISE GUILLET, presentata (*) dal Socio S. RANZI.

RIASSUNTO. — Gli esperimenti descritti in questa Nota dimostrano che un ibrido nucleo-citoplasmatico ottenuto trapiantando il nucleo tra due specie *Pleurodeles waltlii* e *P. poireti* mette in evidenza tre ordini di fatti. Si osserva un effetto di competizione tra le attività citoplasmatiche e nucleari che si palesa in una elevata mortalità in stadi successivi alla blastula. Questa letalità si accompagna ad aberrazioni cromosomiche. Nei primi stadi di sviluppo appare dominante l'influenza del citoplasma dell'uovo anucleato. L'effetto del nucleo diviene prevalente nelle larve che riescono a sopravvivere e questo si vede molto bene studiando la lattico deidrogenasi.

Dans des expériences de greffes nucléaires intraspécifiques utilisant des germes donneurs de noyaux porteurs d'une mutation (Axolotl blanc, Pleurodèle mutant mélanique) et des germes receveurs du type sauvage [1] [2], on constate que les caractères des larves et des adultes obtenus correspondent au type du noyau greffé. Un phénomène identique peut être observé dans les cas de greffes nucléaires interraciales [3].

Afin de mettre en évidence les conditions dans lesquelles l'activité du noyau se substitue d'une manière fonctionnelle au conditionnement initial de l'oeuf, des expériences du même type ont été réalisées au niveau interspécifique dans le genre *Pleurodeles*. Des noyaux somatiques diploïdes ($2n$) d'une espèce ont été greffés dans le cytoplasme de l'oeuf activé et énucléé de l'autre espèce: *Pleurodeles waltlii* (P.w.) \leftrightarrow *Pleurodeles poireti* (P.p.).

Dans ces expériences les noyaux donneurs proviennent toujours d'un même embryon. En particulier, la greffe des noyaux d'une même blastula dans les deux types spécifiques de cytoplasme a permis d'obtenir des populations d'animaux isogéniques, différant par la nature de leur cytoplasme initial (jumeaux allocytoplasmiques). Cette méthode rend possible, chez des individus génétiquement identiques, l'observation des effets cytoplasmiques dans les associations intra- et interspécifiques.

L'ensemble de ces expériences comporte trois aspects:

Phénomène de compétition nucléo-cytoplasmique qui se traduit par une forte mortalité.

(*) Nella seduta dell'11 marzo 1972.

Manifestation pendant les premiers stades de l'ontogenèse des effets prévalents liés au conditionnement initial de l'oeuf avant l'énucléation.

Mise en évidence aux derniers stades du bourgeon caudal d'un virage dans les effets observés.

MATERIEL ET METHODES

Les animaux proviennent de souches élevées au laboratoire, d'origine ibérique ou marocaine pour *P. waltlii*, algérienne ou tunisienne pour *P. poireti*. Les stades du développement sont définis par référence à la table établie pour *P. waltlii* [4]. La méthode de greffe nucléaire est celle mise au point pour les Amphibiens Urodèles par Signoret *et al.* [1]. Elle permet d'obtenir des hybrides nucléocytoplasmiques viables de constitutions:

$$\frac{2n \text{ P.w.}}{\text{cyt. P.p.}} \quad \text{et} \quad \frac{2n \text{ P.p.}}{\text{cyt. P.w.}}$$

Nous avons étudié une protéine enzymatique, la *lactate déshydrogénase* (LDH), qui a une spécificité tissulaire et existe sous plusieurs formes moléculaires (isozymes), caractéristiques de chacune des deux espèces [5] [6]. L'électrophorèse est réalisée en gel d'amidon horizontal [5]. L'enzyme est révélée par la technique de Dewey et Conklin [7].

RESULTATS

1) *Mise en évidence d'une compétition nucléo-cytoplasmique.*

Les deux espèces utilisées, *P. waltlii* et *P. poireti*, sont très proches. En particulier, les hybrides F₁ obtenus par croisement sont viables et féconds. Cependant, en F₂, une importante léthalité traduit l'existence d'une barrière génétique [2].

Dans l'hybridation nucléo-cytoplasmique résultant d'une greffe, une relative incompatibilité entre noyau et cytoplasme est mise en évidence. Des diverses expériences réalisées nous retenons le protocole suivant:

Origine des noyaux greffés: Une blastula de *P. waltlii* (mutant mélanique).

Origine des oeufs récepteurs: *P. waltlii* et *P. poireti*.

Les résultats obtenus dans cette expérience (Tableau I) confirment les données obtenues dans un travail précédent [2]. L'association intraspécifique est très généralement fonctionnelle, alors que l'association interspécifique entraîne une léthalité marquée à partir de la gastrulation.

TABLEAU I.

NOMBRE D'OPÉRATIONS		Blastula	Gastrula	Neurula	Ecllosion	Prise de Nourriture
2 n P.w.						
cytoplasme P.w.	cytoplasme P.p.					
102		59 (100%)	26 (44%)	20 (34%)	15 (25,5%)	11 (18,5%)
	137	72 (100%)	21 (29%)	17 (23,5%)	6 (8,5%)	3 (4%)

2) *Prévalence chez les jumeaux allocytoplasmiques du conditionnement initial de l'oeuf: Effet morphologique.* (Pl. I, fig. A).

Le Tableau précédent montre que dans un faible nombre de cas (4 %) des hybrides nucléo-cytoplasmiques viables sont obtenus. Leurs caractères morphologiques peuvent être analysés comparativement à ceux de leurs jumeaux allocytoplasmiques.

Dans l'expérience retenue les embryons isogéniques issus d'une même association nucléocytoplasmique, sont homogènes pour tous les caractères, ce qui confirme les résultats obtenus par ailleurs [8]. Par contre, les embryons résultant de l'association d'un même génome avec des cytoplasmes d'espèces différentes: $\frac{2n \text{ P.w.}}{\text{cyt. P.w.}}$ et $\frac{2n \text{ P.w.}}{\text{cyt. P.p.}}$ ne sont pas semblables aux stades initiaux du développement.

Les oeufs de *P. waltlii* ont un diamètre de 1,7 à 1,8 mm, leur hémisphère animal est fortement pigmenté; les oeufs de *P. poireti* sont plus petits (1,2 à 1,3 mm de diamètre) et uniformément clairs. Un effet cytoplasmique transitoire se traduit au niveau de la pigmentation des embryons isogéniques, qui sont pigmentés de brun lorsque l'oeuf récepteur est du type *P. waltlii*, et uniformément clairs lorsque l'oeuf récepteur est du type *P. poireti*. Toutefois, à partir du stade 30, c'est le contrôle génétique du noyau qui, devenant prévalent, conditionne les caractères de la pigmentation. Ainsi les 11 larves de constitution 2 n P.w./cytoplasme P.w. et les 3 larves de constitution 2 n P.w./cytoplasme P.p. (Tableau I) présentent des caractères pigmentaires particuliers à la mutation mélanique [9] portée par les noyaux greffés et utilisée comme marqueur: absence d'iridophores, grand nombre et répartition uniforme des mélanophores.

Par ailleurs, jusqu'au stade 38, la taille des embryons et des larves à cytoplasme initial *P. waltlii* est supérieure à la taille des individus à cytoplasme *P. poireti*. Ceci résulte de la différence spécifique du volume des oeufs et aussi d'une différence dans la vitesse du développement.

3) *Substitution fonctionnelle du noyau transplanté: Analyse enzymatique (LDH)*

L'analyse par des méthodes biochimiques de l'expression des facteurs génomiques et cytoplasmiques à des stades différents de l'ontogenèse a pu être abordée au cours d'une série d'expériences de greffes nucléaires, parmi lesquelles nous retiendrons le protocole suivant:

Origine des noyaux greffés: Une blastula de *P. poireti*.

Origine des oeufs récepteurs: Une ponte de *P. waltlii*.

Pour les souches de *P. waltlii* et *P. poireti* utilisées dans cette expérience, le zymogramme de la lactate déshydrogénase révèle dans le sang des adultes l'existence de 5 isozymes (LDH 1 à 5). La LDH 1, la plus rapide, a une mobilité identique dans les deux espèces. Par contre, la LDH 5 est beaucoup plus lente chez *P. poireti*. Il en résulte un espacement plus grand des fractions, très caractéristique pour *P. poireti*. Dans la souche *P. waltlii* retenue, les zymogrammes des oeufs et du sang sont semblables (Pl. I, fig. B 1).

L'introduction du noyau *P. poireti* n'entraîne pas une modification rapide de l'aspect du zymogramme des hybrides nucléocytoplasmiques $\frac{2n \text{ P.p.}}{\text{cyt. P.w.}}$, celui-ci reste conforme au type du cytoplasme récepteur jusqu'au stade 27 (bourgeon caudal).

Au stade 28 qui marque l'apparition du battement cardiaque, *la situation se modifie*. Le zymogramme montre alors 7 bandes distinctes. La bande la plus rapide correspond aux deux LDH 1 (*P. waltlii* et *P. poireti*), la deuxième bande est la LDH 2 (*P. waltlii*), la troisième résulte du chevauchement des LDH 2 (*P. poireti*) et LDH 3 (*P. waltlii*). La quatrième est la LDH 4 (*P. waltlii*). La cinquième correspond aux LDH₃ (*P. poireti*) et LDH₅ (*P. waltlii*). Les deux bandes les plus lentes sont les LDH 4 et LDH 5 de *P. poireti* (Pl. I, fig. B 2). A ce stade les 5 fractions de type *P. poireti* (type du noyau greffé) se superposent aux 5 fractions correspondant aux réserves cytoplasmiques (*P. waltlii*). On note qu'aucun recombinant ne peut être décelé.

Du stade 28 au stade 38 (prise de nourriture), l'intensité des fractions correspondant à la LDH initiale du cytoplasme hôte tend à décroître, cependant que les isozymes nouvellement apparues prennent une coloration plus intense. Après la prise de nourriture, seules les LDH de type nucléaire (*P. poireti*) sont décelées, (Pl. I, fig. B 3).

Le problème de la régionalisation de l'activité nucléaire a été abordé au cours de cette étude. Nous avons soumis à l'électrophorèse, d'une part l'ensemble des tissus ecto- et mésodermiques formant les régions céphalique et dorsale, d'autre part l'ensemble du massif vitellin endodermique formant la région troncale et postérieure du tube digestif d'embryons au stade 33 qui précède l'éclosion. Pour l'ensemble des cellules ecto-mésodermiques, le zymogramme indique une superposition des fractions d'origines cytoplasmique

et nucléaire. Par contre, le zymogramme des cellules endodermiques révèle à ce stade avancé, une très faible activité de synthèse des enzymes du type nucléaire. Les fractions correspondant aux LDH du cytoplasme initial de l'oeuf sont nettes, compte tenu de la faible quantité de matériel, (Pl. I, fig. B 3).

CONCLUSIONS

Les expériences rapportées montrent que chez un hybride nucléo-cytoplasmique résultant d'une transplantation nucléaire entre les deux espèces *P. waltlii* et *P. poireti*, trois ordres de faits peuvent être mis en évidence:

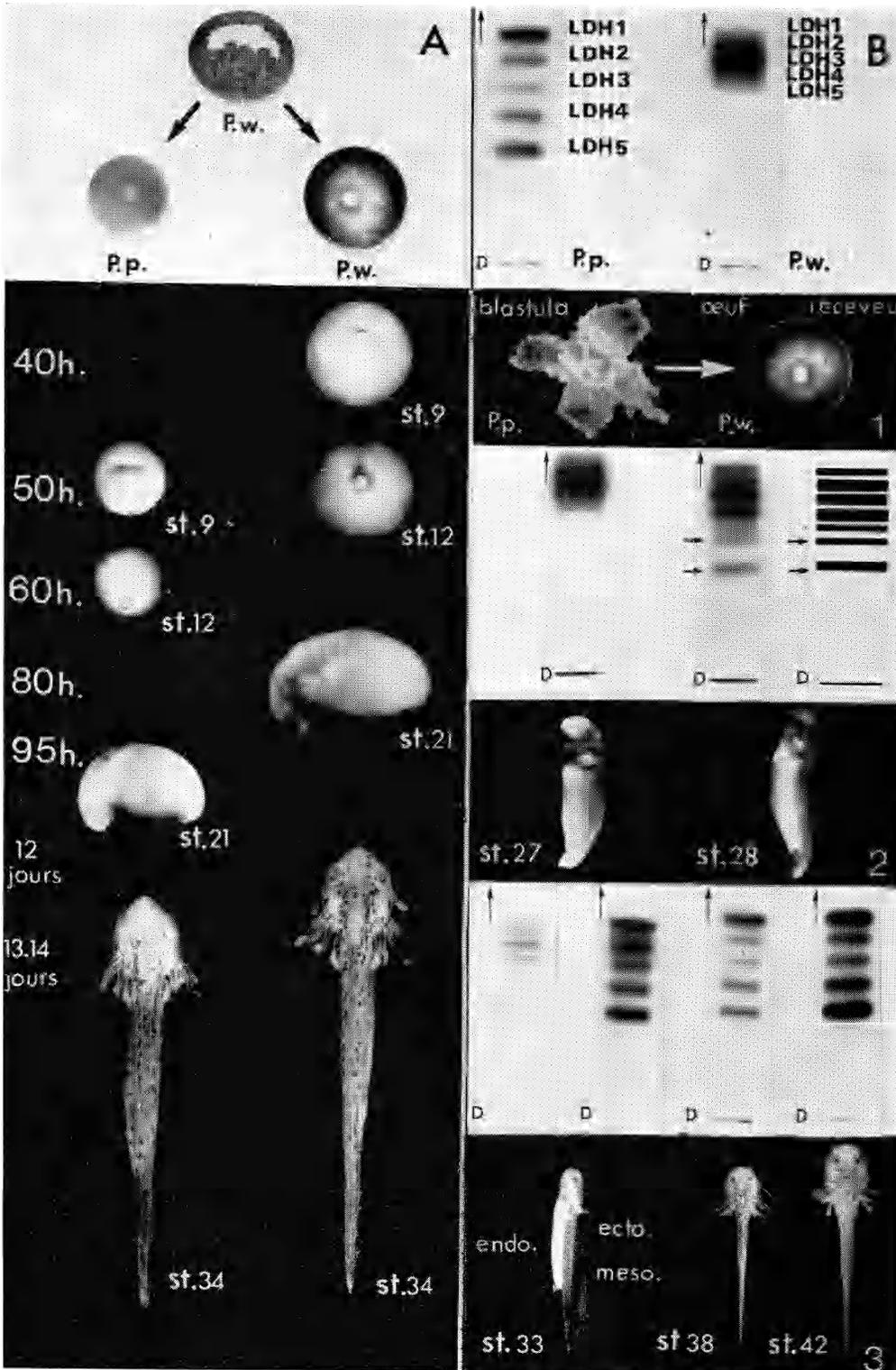
Un effet de compétition entre les activités cytoplasmiques et nucléaires se traduisant par une léthalité élevée aux stades du développement qui suivent la blastula. Cette léthalité va de pair avec des aberrations chromosomiques.

Dans un premier temps du développement, l'influence cytoplasmique résultant du conditionnement initial de l'oeuf énucléé apparaît dominante.

L'effet nucléaire devient prévalent chez les larves qui survivent, ceci a pu être démontré par l'étude d'une enzyme particulière la lactate déshydrogénase.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. SIGNORET, R. BRIGGS et R. R. HUMPHREY, *Nuclear transplantation in the axolotl*, « Dev. Biol. », 4, 134-164 (1962).
- [2] C. L. GALLIEN, *Recherches sur la greffe nucléaire interspécifique dans le genre Pleurodeles (Amphibien-Urodèle)*, « Ann. Embr. Morph. », 3, 145-192 (1970).
- [3] G. ORTOLANI, M. FISCHBERG et S. SLATKINE, *Nuclear transplantations between two subspecies of Xenopus laevis (Xenopus laevis laevis and Xenopus laevis petersi)*, « Acta. Embr. Morph. Exp. », 9, 187-202 (1966).
- [4] L. GALLIEN et M. DUROCHER, *Table chronologique du développement chez Pleurodeles waltlii Mich.*, « Bull. Biol. France et Belgique », 91, 97-114 (1957).
- [5] M. TH. CHALUMEAU-LE FOULGOC, *Recherches sur les protéines sériques au cours du développement et chez l'adulte dans le genre Pleurodeles (Amphibien-Urodèle)*, « Ann. Embr. Morph. », 2, 387-417 (1969).
- [6] C. L. GALLIEN, *Etude de la lactate déshydrogénase chez les hybrides obtenus par croisements expérimentaux entre deux espèces d'Amphibiens Urodèles: Pleurodeles waltlii Michah. et Pleurodeles poireti Gervais*, « C.R. Acad. Sc. » 270, 3141-3143 (1970).
- [7] M. M. DEWEY et J. L. CONKLIN, *Starch gel electrophoresis of lactic deshydrogenase from Rat kidney*, « Proc. Soc. Ecp. Biol. Med. », 105, 492-495 (1960).
- [8] C. AIMAR, *Analyse par la greffe nucléaire des propriétés morphogénétiques des noyaux embryonnaires chez Pleurodeles waltlii (Amphibien-Urodèle)*, « Ann. Embr. Morph. », 5, 5-42 (1972).
- [9] J. C. LACROIX et A. CAPURON, *Sur un facteur récessif modifiant le phénotype pigmentaire de la larve chez l'Amphibien Urodèle Pleurodeles waltlii Michahelles*, « C.R. Acad. Sc. », 270, 2122-2123 (1970).



EXPLICATION DE LA PLANCHE I

Fig. A. — Montage photographique montrant le développement de deux embryons isogéniques allocytoplasmiques. Noter les différences dans l'aspect morphologique et la vitesse du développement.

Fig. B. — 1. Zymogramme (LDH) de la femelle *P. poireti* fournissant la blastula donneuse (sérum) et zymogramme des oeufs vierges *P. waltlii* activés et énucléés (cytoplasme récepteur).

2. Zymogramme d'un embryon hybride nucléo-cytoplasmique $2n$ P.p./cytoplasme P.w. au stade 27 (extrait total), zymogramme d'un embryon hybride nucléo-cytoplasmique $2n$ P.p./cytoplasme P.w. au stade 28 (extrait total).

3. Zymogrammes d'un embryon hybride nucléo-cytoplasmique $2n$ P.p./cytoplasme P.w. au stade 33 (massifs endodermique et ecto-mésodermique). Zymogrammes (LDH) d'une larve hybride nucléo-cytoplasmique $2n$ P.p./cytoplasme P.w. aux stades 38 et 42 (extraits totaux).

Les oeufs, les embryons et les larves sont représentés à des échelles différentes; D, départ.