

Tome II

Décembre 1962

Numéro 4

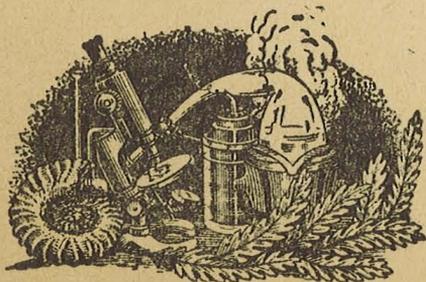
Mémoire I

BULLETIN
DE LA
SOCIÉTÉ LORRAINE DES SCIENCES

Ancienne Société des Sciences de Nancy
(FONDÉE EN 1828)

TRIMESTRIEL

Abonnement annuel : 13 Fr.



NANCY

IMPRIMERIE GEORGES THOMAS

Angle des rues de Solignac et Henri-Lepage

1962

AVIS AUX MEMBRES

COTISATIONS. — Les cotisations (12 NF) peuvent être réglées à M. CÉZARD, Jardin Botanique, Nancy. C.C.P. Nancy 45-24.

SÉANCES. — Les réunions ont lieu le deuxième jeudi de chaque mois, sauf vacances ou fêtes tombant ce jour, à 17 heures, Salle d'honneur de l'Université, 13, place Carnot, Nancy.

BIBLIOTHÈQUE. — Une très riche bibliothèque scientifique est mise à la disposition des Membres. Par suite d'un accord entre la Société et la Municipalité, les ouvrages sont en dépôt à la Bibliothèque Municipale, rue Stanislas, Nancy. Les Membres ont droit d'office au prêt des ouvrages, aussi bien ceux appartenant au fonds de la Société qu'au fonds de la Ville.

Sauf en périodes de vacances, la Bibliothèque est ouverte tous les jours. Se renseigner près du Conservateur de la Bibliothèque Municipale.

BULLETIN. — Afin d'assurer une parution régulière du Bulletin, les Membres ayant fait une communication sont invités à remettre leur manuscrit en fin de séance au Secrétaire du Bulletin. A défaut, ces manuscrits devront être envoyés à son adresse (141, avenue Carnot, Saint-Max) dans les quinze jours suivant la séance. Passé ce délai, la publication sera ajournée à une date indéterminée.

Les corrections d'auteurs sur les épreuves du Bulletin seront obligatoirement faites dans les huit jours suivant la réception des épreuves, faute de quoi ces corrections seront faites d'office par le Secrétaire, sans qu'il soit admis de réclamations. Les demandes de tirés à part non formulées en tête des manuscrits ne pourront être satisfaites ultérieurement.

Les clichés sont à la charge des auteurs.

Il n'y a pas de limitation de longueur ni du nombre des communications. Toutefois, les publications des travaux originaux restent subordonnées aux possibilités financières de la Société. En cas d'abondance de communications, le Conseil déciderait des modalités d'impression.

Il est précisé une nouvelle fois, en outre, que les observations, théories, opinions, émises par les Auteurs dans les publications de la Société des Sciences de Nancy, n'impliquent pas l'approbation de notre groupement. La responsabilité des écrits incombe à leurs Auteurs seuls.

AVIS AUX SOCIÉTÉS CORRESPONDANTES

Les Sociétés et Institutions faisant avec la Société Lorraine des Sciences l'échange de leurs publications sont priées de faire connaître dès que possible, éventuellement, si elles ne reçoivent plus ses bulletins. La publication ultérieure de la liste révisée des Sociétés faisant l'échange permettra aux Membres de connaître les revues reçues à la Bibliothèque et aux Correspondants de vérifier s'ils sont bien portés sur les listes d'échanges.

L'envoi des échanges doit être fait à l'adresse : Bibliothèque de la Société Lorraine des Sciences, Bibliothèque Municipale, rue Stanislas, Nancy.

Laboratoire de Physiologie de la Faculté des Sciences de Nancy
et Laboratoire d'Anatomie de la Faculté de Médecine de Liège

Annie BONICHON

**Recherches histochimiques et biochimiques
sur le développement des lobes optiques
chez l'Embryon de Poulet**

THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT

1962

Recherches
histochimiques et biochimiques
sur le développement des lobes optiques
chez l'Embryon de Poulet

I. - Introduction

L'étude de corrélations entre la structure anatomique, la fonction et la constitution chimique du tissu nerveux rencontre une difficulté majeure. L'activité nerveuse résulte de la sommation de phénomènes extrêmement brefs, et, ce qui est plus grave, réversibles. Aussi, une résultante globale, accessible à l'analyse chimique, n'est-elle généralement obtenue que par des artifices qui nous éloignent du fonctionnement normal. Néanmoins, à la fin d'une revue des résultats acquis, RICHTER (1952) écrivait qu'il existe un certain nombre de faits prouvant que des changements biochimiques sont associés à différents états de l'activité nerveuse.

Mais une autre approche peut fournir des renseignements sur ces corrélations, en évitant tout artifice : l'étude des aspects chimiques de la différenciation structurale et fonctionnelle au cours de l'embryogenèse. Une telle approche permet, de plus, une étude simultanée des bases chimiques d'autres phénomènes biologiques primordiaux. En effet, le développement d'un organe embryonnaire est caractérisé par la multiplication cellulaire, la croissance, la différenciation et l'apparition d'une activité fonctionnelle (HAMBURGER et LEVI-MONTALCINI, 1950), phénomènes se reflétant tant au niveau de la structure de la cellule que de son métabolisme. Nous avons étudié, pour chacun d'eux, les composantes biochimiques essentielles qui le caractérisent. Il ne faut cependant pas oublier que cette évolution n'est pas discontinue, et que les cloisons dressées pour la clarté de l'exposé ne sont pas étanches.

Ces recherches sont grandement facilitées par le travail morphologique minutieux qui a permis de décrire, dans le matériel que nous avons choisi, l'établissement de stades précis dans le développement embryonnaire. En effet, la structure du mésencéphale de l'embryon de Poulet est fort bien connue, et a été l'objet de nombreux travaux, datant, pour la plupart, de la fin du siècle dernier. Nous ne les citerons

pas tous, mais nous ne pouvons passer sous silence des noms tels que BELLONCI (1888), RAMON Y CAJAL (1891, 1911), VAN GEHUCHTEN (1892), RIS (1899).

1) *Multiplication cellulaire.*

ZEUTHEN et SCHERBRAUM (1954) montrent que la synthèse de l'ADN est un facteur important de la division cellulaire. C'est un constituant caractéristique des chromosomes et tout l'ADN cellulaire est probablement lié à ces structures. La synthèse d'ADN précéderait la mitose (BARNER et COHEN, 1954 ; MARUYAMA, 1956 ; FIRKET, 1957). D'autre part, BOIVIN, VENDRELY et VENDRELY (1948), MIRSKY et RIS (1949), ont démontré que la teneur en ADN de cellules individuelles a une valeur constante, caractéristique d'une espèce. D'un point de vue général, il apparaît que l'ADN est le paramètre le plus stable d'un tissu. Une augmentation de l'ADN tissulaire est donc significative d'une augmentation du nombre des cellules (HOTCHKISS, 1955), et inversement l'activité mitotique d'un tissu est définie par le taux global de l'ADN.

Dans le tissu nerveux, les cellules cessent très tôt de se diviser ; mais l'étude de l'ADN n'en fournit pas moins des renseignements précieux pour étayer nos recherches, en particulier sur l'une des composantes intervenant dans le phénomène suivant.

2) *Croissance cellulaire.*

Les phénomènes de division sont suivis par une phase d'augmentation du volume des cellules. Cette croissance implique une synthèse de matériel protéique et elle peut être définie, du point de vue biochimique, comme une augmentation de ces synthèses. Nous avons évalué la production de protéines par le dosage de l'azote tissulaire total, et par l'étude de composantes cellulaires connues comme intervenant dans le processus même de la synthèse : l'acide ribonucléique (ARN) et la phosphatase alcaline.

L'ARN joue un rôle central dans la synthèse des protéines, comme l'ont suggéré CASPERSSON (1941) et BRACHET (1942), dont les conclu-

Liste des abréviations : ADN = acide désoxyribonucléique ; P-ADN = phosphore de l'acide désoxyribonucléique ; ARN = acide ribonucléique ; ATP = acide adénosine triphosphorique ; ADP = acide adénosine diphosphorique ; AMP = acide adénosine monophosphorique ; DPN = diphosphopyridine nucléotide ; DPN-H = diphosphopyridine nucléotide réduit ; SDH = succinodéshydrogénase ; ACh = acétylcholine ; AChE = acétylcholinestérase ; ChE = cholinestérase non spécifique.

sions ont été entièrement confirmées depuis (GALE, 1953 ; HOTCHKISS, 1955). Cet acide présente un intérêt particulier dès qu'il s'agit du système nerveux, puisque les corps de Nissl de la cellule nerveuse sont constitués de nucléoprotéines (CASPERSSON, 1941 ; HYDEN, 1943). Mais dans cette phase du développement, c'est surtout l'ARN du nucléole qui doit nous préoccuper.

D'autre part, une enzyme présente dans toutes les cellules de l'organisme, la phosphatase ou phosphomonoestérase alcaline, jouerait un rôle dans la synthèse protéique (BRADFIELD, 1947 ; DAVIDSON, 1949), bien que son intervention soit assez obscure et même contestée (BOURNE, 1948). S'il est vrai que cette enzyme prenne place dans des chaînons cataboliques, elle peut intervenir dans l'anabolisme en fournissant le matériel phosphate. Un exemple frappant est donné par l'activité intense de cette enzyme dans le périoste où le besoin de phosphates pour la formation des apatites explique aisément la présence de l'enzyme. Quoiqu'il en soit, nous verrons que cette enzyme semble intervenir dans le phénomène de croissance cellulaire. D'ailleurs, nous aurions déjà pu en parler à propos de la multiplication, puisque le métabolisme des acides nucléiques implique nécessairement l'intervention de nombreuses phosphatases. Le taux de phosphomonoestérase alcaline du noyau semble en rapport avec le taux de renouvellement du phosphore de l'ADN (BRACHET et JEENER, 1946) ; dans le cortex cérébral, elle est plusieurs fois plus active dans les noyaux chez le jeune que chez l'adulte (DOUNCE, 1950). Quant à la phosphatase alcaline cytoplasmique, elle est pour la plus grande partie associée aux granules d'ARN.

On peut aussi envisager l'utilité de la phosphatase alcaline pour reformer, à partir du produit principal de dégradation des réserves énergétiques de l'organisme, à savoir l'acide adénosinediphosphorique (ADP), le composé phosphoré constituant l'élément le plus important de cette réserve, l'acide adénosinetriphosphorique (ATP).

3) *Différenciation et apparition d'une activité fonctionnelle.*

La différenciation implique la spécialisation progressive des cellules, tant sur le plan morphologique que sur les plans biochimique et fonctionnel.

Au cours de la différenciation, la cellule acquiert ses caractères typiques de neurone, cellule de type souvent multipolaire, à nombreux prolongements courts et ramifiés, les dendrites, et possédant un prolongement long et mince, l'axone. Le périkyon renferme, outre les inclusions banales telles que mitochondries et gouttelettes lipidiques,

un réseau dense de neurofibrilles se continuant dans les prolongements du neurone, et des corps de Nissl, ces derniers toujours absents de l'axone. Le noyau présente généralement un gros nucléole. Très longtemps controversée, la présence des neurofibrilles dans la cellule vivante n'est plus mise en doute : elle a été reconnue au microscope à contraste de phase. L'apparition de substance neurofibrillaire indiquerait une orientation des protéines qui, dans certains cas, s'agrègeraient en filaments visibles au microscope électronique. L'existence réelle des corps de Nissl a fait, pendant longtemps, l'objet de polémiques. On a voulu y voir un artefact de précipitation. Les dernières études, tant au microscope ordinaire, après fixation par la méthode de congélation-dessiccation, qu'au microscope à contraste de phase et au microscope électronique, prouvent que les corps de Nissl appartiennent bien au cytoplasme différencié.

Sur le plan biochimique, la synthèse protéique se poursuit dans le sens d'une organisation particulière de protéines probablement banales (et ce pourrait être le cas pour les neurofibrilles), et dans le sens de la synthèse de protéines particulières, spécifiques, ou du moins d'une abondance spécifique de protéines que l'on rencontre dans des cellules différenciées dans une autre direction. Un exemple de cette dernière catégorie de protéines est donné par les corps de Nissl, amas énormes de nucléoprotéines dont l'acide nucléique est l'ARN. Nous avons donc continué, au cours de cette phase du développement, l'étude de l'ARN dans le mésencéphale.

La synthèse de ces masses d'ARN nécessite l'intervention de la phosphatase alcaline et nous avons, bien entendu, poursuivi l'étude de cette enzyme.

Le terme de protéines spécifiques peut aussi désigner des éléments qui ne servent pas essentiellement à l'architectonique de la cellule, mais ont des fonctions bien définies, par exemple : les enzymes. Nous avons choisi, comme critères de la différenciation, deux enzymes : l'acétylcholinestérase ou cholinestérase spécifique et la succinodéshydrogénase.

Les travaux de FELDBERG et VOGT (1948) ont mis en évidence le rôle de l'acétylcholine (ACh) en temps que médiateur chimique de l'influx nerveux au niveau des synapses. Un peu plus tard, NACHMANSOHN et MEYERHOF (1941) élaborent une théorie selon laquelle l'ACh n'aurait pas seulement un rôle intercellulaire, mais aussi un rôle intracellulaire, l'ester de la choline intervenant dans les variations de perméabilité de la membrane (voir schéma de Nachmansohn).

L'influx nerveux se propage le long de l'axone grâce à des courants électriques. La génération de ces courants est due à des mouvements

d'ions à travers la membrane. Au cours de l'activité, des ions Na^+ pénètrent dans la fibre nerveuse en traversant la membrane ; le flux de Na^+ est suivi par un flux de K^+ qui traverse la membrane vers l'extérieur. C'est l'ACh qui faciliterait le passage des ions.

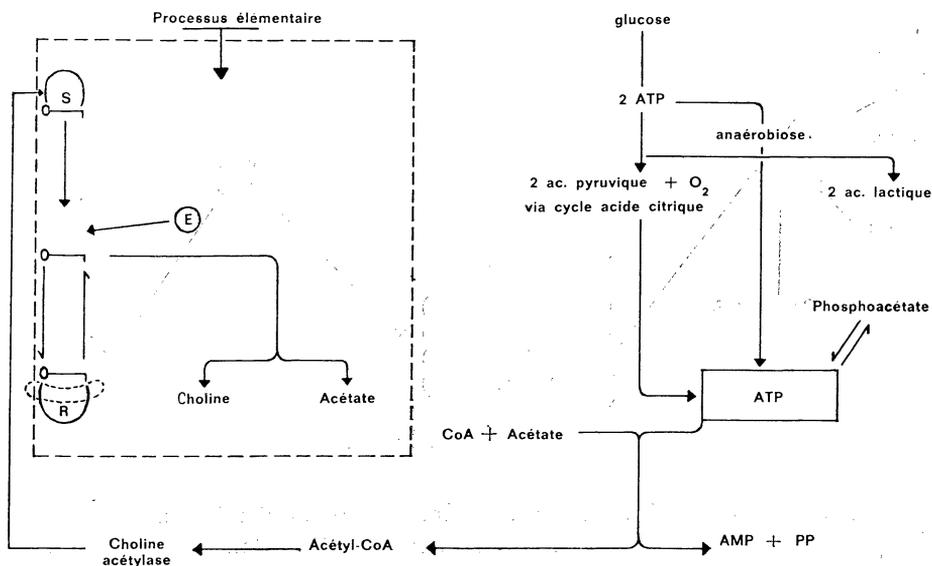


Schéma de Nachmansohn

Dans la cellule nerveuse au repos, l'ACh est sous une forme inactive, liée à une protéine ou une lipoprotéine (S). Au cours d'une excitation, l'ACh est libérée et se combine à un récepteur (R) dont elle ferait varier la forme, permettant ainsi le passage des ions. L'ACh libre est attaquée par une enzyme, l'acétylcholinestérase (E). L'équilibre entre l'ACh et son récepteur est déplacé ; toute l'ACh est hydrolysée et la membrane revient à son état de repos.

L'entrée du Na^+ et la sortie du K^+ se font dans le sens d'un gradient de concentration, ce déplacement exigeant peu d'énergie. Par contre, dans la période de restauration, le mouvement des ions se fait contre un gradient de concentration, ce qui nécessite de l'énergie, fournie, comme on le voit sur le schéma de Nachmansohn, par la réserve d'ATP.

La synthèse de l'ACh elle-même exige de l'énergie ; elle est catalysée par une enzyme : la choline-acétylase. C'est à NACHMANSON et MACHADO (1943) que revient le mérite d'avoir mis en évidence le rôle de

l'A.T.P. dans cette synthèse. L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire à l'acétylation de la choline. C'était là la première démonstration de l'intervention de l'ATP hors du cycle de Krebs (voir le schéma d'Augustinsson, 1950).

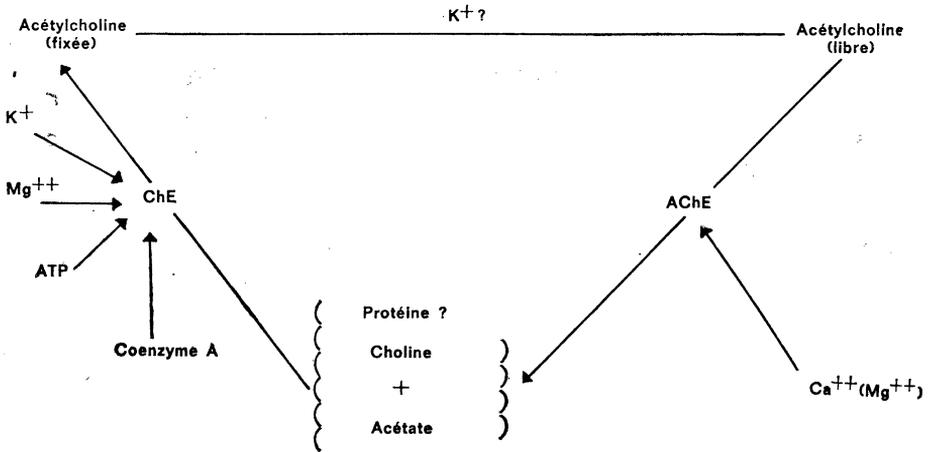


Schéma d'Augustinsson

L'acétylcholinestérase intervient dans la repolarisation de la fibre après le passage de l'influx, en détruisant l'ACh. Dans le système de l'ACh, — choline-acétylase, acétylcholine, acétylcholinestérase —, c'est l'AChE qui est généralement utilisée comme critère d'activité nerveuse, cette enzyme se prêtant à la fois à une étude histochimique et biochimique, et l'ACh étant une substance instable dont les dosages sont difficiles et aléatoires.

Pour saisir l'importance de l'acétylcholinestérase, il n'est point nécessaire d'accepter tous les termes de l'hypothèse de NACHMANSOHN. En effet, celle-ci peut soulever certaines objections. Signalons, par exemple, qu'elle n'explique pas le retard bien connu de la transmission nerveuse au niveau de la synapse. Néanmoins, discutable quant il s'agit de l'ensemble du neurone, cette théorie est universellement admise dès qu'il est question de la synapse, du moins lorsqu'il s'agit d'une jonction dont la portion afférente est constituée par des terminales d'une fibre cholinergique.

Les rapports entre l'activité de la choline-acétylase, la teneur en acétylcholine et l'activité de l'AChE sont en général constants, la mesure d'une activité ou le dosage de l'ACh renseignant sur l'ensemble de cette chaîne. Il existe quelques exceptions, mais elles ne concernent pas notre matériel. L'apparition d'acétylcholinestérase indiquera donc une différenciation spécifique présageant l'apparition de l'activité propre

à la cellule nerveuse, la transmission des influx nerveux. L'étude de l'AChE nous a permis de faire en même temps celle de la cholinestérase non spécifique, dont le rôle est malheureusement plus obscur. Celle-ci hydrolyse des esters de choline à chaîne carbonée plus longue ; elle agit néanmoins sur l'ACh, mais l'hydrolyse est très lente dans ce cas.

A côté de cette différenciation spécifique, il y en a d'autres qui lui servent de soutien et qui constituent des différenciations non spécifiques. C'est le cas pour les différenciations dont le rôle se réduit à faciliter l'apport de l'énergie nécessaire au processus de la différenciation spécifique.

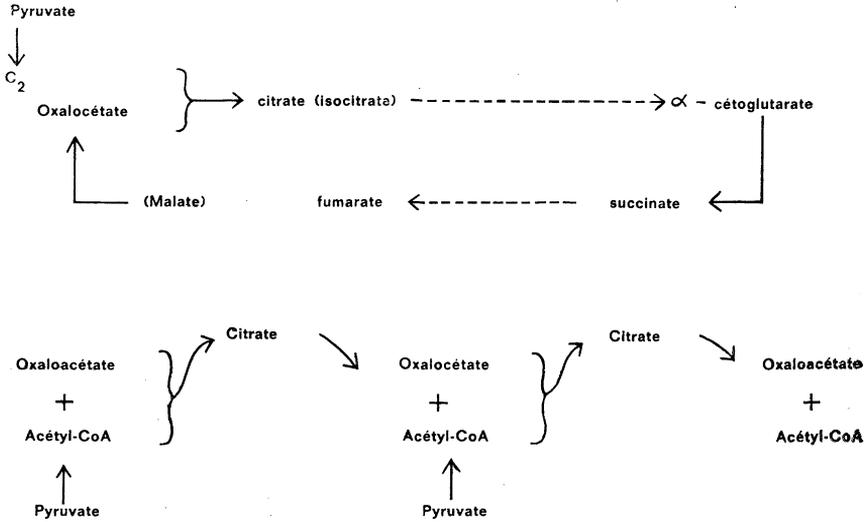
La phosphatase alcaline, permettant l'apport de phosphates pour la régénération d'ATP constitue déjà l'une de ces différenciations. Mais il semble que l'activation des enzymes intervenant dans le cycle de Krebs soit au moins tout aussi importante.

Tout composé organique possède une énergie potentielle due aux liaisons entre les atomes de la molécule. La libération de l'énergie se fait au cours d'étapes successives ; l'oxydation biologique est un phénomène complexe dans lequel interviennent des chaînes réactionnelles et des cycles au cours desquels l'énergie est captée, transportée, échangée et distribuée. Ces processus impliquent l'intervention de nombreuses enzymes, agents de cette « combustion contrôlée », chacune spécialisée dans la catalyse d'une réaction de la série. On admet trois étapes essentielles dans la transformation de l'énergie (LEHNINGER, 1960).

Dans une première étape, les différents métabolites subissent une dégradation enzymatique. Les glucides sont scindés en molécules d'acide pyruvique ; celui-ci est converti en un composé à 2 C, dont la forme active est l'acétylcoenzyme A. A ce stade, les lipides et une partie des protéines entrent dans le système, l'acétyl-CoA représentant une sorte de dénominateur commun des diverses structures de l'aliment énergétiqué.

Dans une deuxième étape, l'acétyl-CoA est introduit dans un cycle réactionnel, le cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs, où sa dégradation totale aura pour terme ultime la libération d'H₂O et de CO₂ ; l'énergie de la molécule est libérée. L'introduction de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs a lieu par condensation avec un acide à 4 C, l'acide oxaloacétique, pour donner de l'acide citrique. C'est au cours d'étapes successives, contrôlées par des enzymes, que les composés intermédiaires subissent des décarboxylations et des déshydrogénations au terme desquelles l'acide oxaloacétique est régénéré et l'énergie disponible.

Les atomes d'hydrogène n'entrent pas directement en combinaison avec l'oxygène moléculaire. Ces atomes ou leurs équivalents, les électrons libérés lorsque l'hydrogène est ionisé, sont transportés vers l'oxygène par l'intermédiaire d'une chaîne de transporteurs d'électrons (chaîne respiratoire, constituant *la troisième étape*) capable d'accepter des électrons d'un voisin de la chaîne et de le céder au suivant. A chaque étape du transfert, les électrons perdent une partie de leur énergie. Dans le cycle, des électrons sont déplacés du pyruvate, de l'isocitrate, de l' α -cétoglutarate, du succinate et du malate. Tous ces substrats, sauf le succinate, sont liés à la chaîne respiratoire par l'intermédiaire du DPN, qui passe à l'état de DPNH. L'oxydation de l'acide succinique en acide fumarique se fait sans qu'intervienne le DPN, par passage direct sur les cytochromes.



Le couplage des oxydations au niveau du cycle de Krebs avec la synthèse de composés phosphorés riches en énergie constitue la phosphorylation oxydative. On sait que, du point de vue physiologique, le couplage des oxydations et des phosphorylations correspond au rendement énergétique de la nutrition (LOWY, 1959).

Ces dernières années, l'objectif de nombreux chercheurs a été de déterminer les différentes séquences du transfert des électrons au cours de la troisième étape. Deux schémas ont été proposés récemment par GREEN et FLEISCHER (1960).

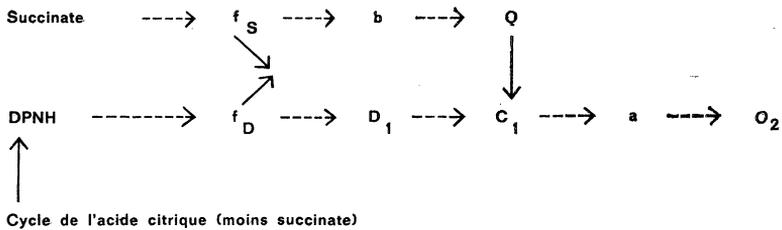


Schéma 1

Lire Oxaloacétate au lieu de Oxalocétate.

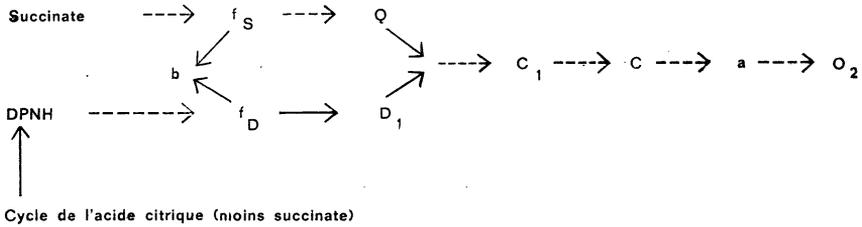


Schéma 2

f_S = déshydrogénase de l'ac. succinique ; f_D = déshydrogénase du DPNH ;
 Q = coenzyme Q ; D_1 = déshydrogénase de l'acide lipoiique.

L'étude d'une des étapes du cycle de Krebs permet d'évaluer l'activité métabolique. Nous avons choisi la succinodéshydrogénase (transformant le succinate en fumarate) en milieu anaérobie, et le système de la succinoxydase, constitué par l'enzyme précédente à laquelle s'ajoute la série des cytochromes qui forment la cytochrome oxydase, opérant en milieu aérobie et aboutissant à la réduction de l' O_2 pour donner H_2O . Ce choix nous a été dicté, non seulement par des considérations techniques, mais par la place suffisamment isolée, occupée par ces réactions dans l'ensemble des systèmes libérateurs d'énergie.

A tout moment, nous avons cherché à établir les corrélations entre ces différenciations biochimiques et les différenciations morphologiques et fonctionnelles.

II. - Matériel et méthodes

Ce travail est effectué sur des embryons de Poulet de race Rhode Island red provenant d'un élevage privé. Le développement embryonnaire a lieu au laboratoire, dans de petits incubateurs maintenus à la température constante de 38°C., dans des conditions hygrométriques convenables. Le développement des embryons est apprécié, non à l'aide des temps d'incubation, mais grâce aux critères morphologiques définis par HAMILTON (1952). En effet, bien que la période d'incubation de l'œuf de Poule soit de 21 jours, on observe des variations notables dans les stades de développement d'embryons mis en incubation au même moment.

Nos observations débutent au *stade* 25 (4 j. 1/2) ; ce n'est qu'à ce stade que le mésencéphale est suffisamment individualisé pour qu'on puisse l'isoler correctement. Les expériences sont poursuivies systématiquement sur tous les stades jusqu'à l'éclosion et même un ou deux jours après l'éclosion, lorsque nous le jugeons nécessaire.

Les embryons sont disséqués dans du liquide physiologique simple (NaCl à 9 ‰). Les prélèvements se font à la température du laboratoire lorsqu'il s'agit d'études d'enzymes du cycle oxydatif (succinoxydase, succinodéshydrogénase), le froid étant néfaste à l'activité de ces enzymes (PORTER et coll., 1953) et à 2°C. dans les autres cas.

L'isolement du mésencéphale est rapide, il ne dure qu'une à deux minutes. Nous procédons sous la loupe binoculaire, en nous aidant de ciseaux et de pinces à iridectomie et d'aiguilles de verre, suivant la technique de WOLFF et HAFEN (1952). Le mésencéphale est soigneusement libéré de ses enveloppes ectodermique et mésenchymateuse.

Les changements cellulaires qui interviennent au cours de la différenciation du mésencéphale sont envisagés tant sous l'angle biochimique que sous l'angle histochimique, car, ainsi que l'écrit WEISS (1955, p. 376) « Any fundamental distinction between physicochemical (sometimes called « physiological ») and morphological differentiation is thus purely artificial, for it refers not to any dicotomy in the properties

of a cell but merely to two different techniques of observation, both with definite limitations, hence, supplementing each other. »

Nos études par des méthodes biochimiques portent sur :

- le dosage de l'azote tissulaire total ;
- la détermination de l'activité cholinestérasique ;
- la détermination de l'activité du système de la succinoxydase.

L'avantage de ces méthodes sur les techniques histochimiques réside dans la nature quantitative des résultats à chaque stade de la croissance embryonnaire.

Les méthodes histochimiques nous ont servi pour la localisation et l'évolution de :

- l'ADN et l'ARN ;
- l'activité de la phosphatase alcaline ;
- l'activité de la succinodéshydrogénase ;
- l'activité de l'acétylcholinestérase et de la cholinestérase non spécifique.

Ces méthodes complètent heureusement les techniques biochimiques en précisant la localisation exacte des substances ou des enzymes étudiées. L'examen histologique du mésencéphale montre qu'il est constitué de différents types de cellules : neurones, cellules de la névroglie, cellules sanguines et vasculaires, cellules épendymaires. La cellule nerveuse elle-même est complexe, elle peut être à différents stades de son évolution. L'histochimie nous permet d'esquisser l'atlas chemoarchitectonique du mésencéphale.

METHODES BIOCHIMIQUES.

A. — *Dosage de l'azote tissulaire total.*

La croissance tissulaire est estimée en prenant pour indice le taux d'azote total à chaque stade du développement. Cette valeur représente la masse du protoplasme actif (HOLTER et LINDERSTRÖM-LANG, 1951), le tissu embryonnaire étant vraisemblablement dépourvu de réserves qui ne seraient pas impliquées dans le métabolisme. L'azote qui se trouve sous forme organique est minéralisé en présence d'un catalyseur en milieu acide. Il est dosé par la méthode de microdiffusion de CONWAY (1950) : il passe à l'état d'ammoniac volatil par addition de potasse caustique. Cet ammoniac est adsorbé par de l'acide borique et dosé par une méthode titrimétrique.

Les mesures sont effectuées sur des homogénats de mésencéphale conformes aux exigences de POTTER (1948), dans du liquide physiologique. Nous utilisons l'appareil décrit par POTTER et ELVEJHEM (Tissue Grinder, Arthur H. Thomas, Philadelphie U.S.A.).

— MINÉRALISATION.

Une partie aliquote de l'homogénat est placée dans un tube à essais avec 1 ml du mélange de Needham et Boell

Cu SO ₄	3 g
K ₂ SO ₄	1 g
Se O ₂	0,1 g
H ₂ SO ₄	300 ml

La minéralisation est accélérée par chauffage au bain de sable électrique.

— MICRODIFFUSION.

Elle se poursuit dans des « unités » de CONWAY. Le liquide de minéralisation est dilué 20 fois. 1 ml de cette solution est placé dans le compartiment annulaire ; 1 ml de réactif borique dans le compartiment central. Immédiatement avant de fermer l' « unité » de Conway, on ajoute 1 ml de KOH à 40 %. La cellule est placée sur une table d'agitation électromagnétique. Au bout de 90 minutes, la diffusion est complète.

Réactif borique : 10 g d'acide borique sont introduits dans un ballon d'un litre, avec 200 ml d'alcool et 700 ml d'eau distillée. L'acide borique est porté en solution. On ajoute alors 10 ml d'indicateur coloré :

vert de bromocrésol	0,033 g
rouge de méthyle	0,066 g
alcool	q. s. 100 ml

Le réactif est amené à la teinte de virage par addition de potasse, et ajusté à 1 000 ml.

— DOSAGE.

L'ammoniac adsorbé par l'acide borique est dosé directement par une solution d'H₂SO₄ N/50 à l'aide d'une seringue micrométrique AGLA (Burroughs Wellcome & C^o, Londres, G.B.).

Cette méthode permet de doser des quantités d'azote comprises entre 10 et 100 µg.

B. — *Détermination de l'activité du système de la succinoxydase.*

L'oxydation du succinate en fumarate dans les tissus animaux est liée à l'O₂ par l'intermédiaire du cytochrome c et de la cytochrome oxydase. Même dans un tissu homogénéisé, cette chaîne enzymatique agit comme un système multienzymatique dont l'activité finale dépend de l'intégrité de chaque composant. La chaîne complète est désignée par le terme succinoxydase, alors que le terme succinodéshydrogénase est réservé à la première déshydrogénase acceptant les électrons du succinate.

Le système de la succinoxydase menant la déshydrogénation du succinate à son terme ultime, la formation d'H₂O, son activité est définie par la mesure du taux d'oxygène consommé lorsque le système enzymatique est en présence de son substrat. En présence de succinate seul, la réduction du cytochrome c et de la cytochrome oxydase est définie et limitée par le taux d'activité du premier maillon de la chaîne, la succinodéshydrogénase. En présence d'un excès de cytochrome c ajouté, le taux de consommation d'O₂ dépend du taux de réduction du cytochrome c. L'estimation de l'activité du système de la succinoxydase est effectuée suivant la technique manométrique décrite par RINGLER et SINGER (1959). Les mesures se font à l'air atmosphérique. Jusqu'au *stade* 35 du développement embryonnaire, nous utilisons des microfioles de 5 ml ; au-delà de ce stade, des fioles de 15 ml.

Le tissu est homogénéisé dans le mélange isotonique : chlorure de potassium 0,13 M. Tampon phosphate de Sørensen 0,01 M, à pH 7,4. (Homogénat 1/10 — poids/volume).

L'effet de la température, de la concentration en substrat et en cytochrome c sont étudiés sur des homogénats de mésencéphale d'embryons au stade 40. Ces essais préliminaires déterminent les conditions expérimentales de nos recherches. Ils nous ont indiqué les conditions dans lesquelles nous devons travailler.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE.

On place 0,3 ml d'homogénat dans le compartiment principal de la fiole de Warburg avec 3 ml de succinate 0,02 M dilué dans du tampon phosphate de Sørensen à pH 7,4. On ajoute 0,2 mg de cytochrome c (C.F. BOEHRINGER und SOEHNE, Mannheim, West-Germany), au mélange enzyme-substrat dans la moitié des fioles en expérience (Toutes ces proportions sont réduites au 1/3 lorsqu'on emploie des microfioles).

0,1 ml de KOH à 20 % est placé dans le compartiment central de la fiole.

Les expériences sont poursuivies à 38°C. L'équilibre de température est atteint en 10 minutes dans les fioles. A partir de ce moment, les lectures sont effectuées toutes les 10 minutes pendant 1 heure.

L'activité succinoxydasique est exprimée en μl d' O_2 par mg d'azote et par heure. Des corrections sont faites pour l'oxydation endogène du tissu.

C. — Détermination de l'activité des cholinestérases.

L'activité des cholinestérases est déterminée manométriquement par le taux d'hydrolyse d'une solution d'acétylcholine en milieu bicarbonate ; dans ces conditions, l'acide acétique libéré provoque un dégagement de CO_2 . La réaction est quantitative.

Les mesures sont effectuées à l'appareil de Warburg en anaérobiose (dans un mélange de gaz constitué par 95 % d'azote et 5 % de CO_2) à 37°C. Nous utilisons des fioles de Warburg de 15 ml. L'enzyme, séparée du substrat au début de l'expérience, est ajoutée au temps 0. Nous appliquons la technique décrite et préconisée par AUGUSTINSSON (1957).

Dans une étude de tissu nerveux central, on peut négliger le fait que le substrat utilisé, l'ACh, soit aussi hydrolysé, mais à une vitesse très réduite, par les aliestérases. En outre, on sait que ce tissu est pauvre en cholinestérase non spécifique et celle-ci n'hydrolyse que lentement l'ACh.

— PRÉPARATION ENZYMATIQUE.

Le mésencéphale, prélevé et pesé sur une microbalance, est homogénéisé en présence d'une solution de Ringer au bicarbonate, tamponnée à pH 7,4.

NaCl 0,9 %	100 ml
NaHCO ₃ 1,26 %	30 ml
MgCl ₂ 6H ₂ O 1,76 %	2 ml
Solution saturée du mélange N ₂ + CO ₂ .		

L'homogénat est dilué au 1/50^e (Poids-volume).

— SUBSTRAT.

Il est obtenu à partir d'une solution concentrée de chlorure d'acétylcholine, Laboratoire Lematte et Boinot, Paris, à 4,99 % dans HCl à pH 4,0. Au moment de l'emploi, une partie de cette solution est diluée dans 4 parties de la solution bicarbonate à pH 7,4.

— PROCÉDÉ EXPÉRIMENTAL.

2,6 ml de la solution enzymatique (homogénat) sont placés dans le compartiment principal de la fiole, 0,4 ml de substrat dans le réservoir latéral. Le déplacement de l'air est obtenu par passage d'un litre du mélange de gaz $N_2 + CO_2$ dans chaque fiole. Lorsque la température des fioles est équilibrée, le substrat est mélangé à l'homogénat. Les lectures des manomètres sont faites de 5 en 5 minutes durant 30 minutes (pour les stades qui précèdent l'éclosion, les lectures s'effectuent pendant 10 minutes seulement).

L'activité de la cholinestérase est exprimée en μl de CO_2 par mg d'azote total tissulaire et par heure. Des corrections pour l'hydrolyse non enzymatique du substrat sont faites.

METHODES HISTOCHIMIQUES.

Le choix de la fixation et des techniques est essentiel en histochimie. Les méthodes histochimiques reposent sur l'application de tests biochimiques permettant la détection sur coupes histologiques de substances chimiques. Nous ne devons jamais perdre de vue, lors du choix d'une technique, que celle-ci doit répondre à des exigences morphologiques — elle doit permettre une localisation précise de la substance étudiée — et à des exigences chimiques — elle doit être sûre, sensible, spécifique (LISON, 1953) —.

A. — *Les acides nucléiques.*

Les méthodes d'étude des acides nucléiques sont désormais classiques. Leur détection cytochimique repose sur la réaction d'un des constituants de la molécule, base ou pentose, avec un colorant.

L'ADN.

est mis en évidence par la réaction nucléale de FEULGEN-ROSSENBECK. C'est une réaction en deux temps : dans un premier temps, une hydrolyse ménagée des purines-désoxyriboses par un acide libre des groupements aldéhydiques (FEULGEN et ROSSENBECK, 1924 ; OVEREND, 1950), dans un deuxième temps, ces aldéhydes libres sont colorés par le réactif de Schiff.

Le mésencéphale est fixé durant 24 heures dans le liquide de Helly. La coloration se fait sur lame collodionnée. Les coupes sont soumises

à une hydrolyse de 10 minutes dans de l'acide chlorhydrique 1 N à 60°C. Après un rinçage à l'eau distillée, les coupes sont placées 90 minutes dans le réactif de Schiff (préparé selon COLEMAN, cité par GOMORI, 1952), elles sont rincées dans trois bains de 15 minutes chacun d'eau sulfureuse. Nous faisons une coloration de fond au vert lumière.

La fixation, par le mélange de Helly, nous a donné d'excellents résultats. LESSLER (1953) le considère comme le fixateur de choix de la réaction. La durée d'hydrolyse est un point important ; trop courte, l'hydrolyse est incomplète, trop longue, elle provoque un affaiblissement de la coloration. Elle dépend du fixateur employé et de l'espèce animale. Un point non négligeable est le rinçage très soigneux à l'eau sulfureuse. L'eau distillée provoque l'hydrolyse du réactif de Schiff avec mise en liberté de fuchsine basique qui peut colorer secondairement les éléments basophiles du tissu.

On peut s'étonner que la réaction de Feulgen soit spécifique de l'ADN et que l'ARN ne soit pas mis en évidence simultanément. En fait, l'hydrolyse, même ménagée, que l'on fait subir aux préparations, suffirait, d'après SWIFT (1953), à extraire l'ARN. Le nombre des ouvrages parus depuis 1924, concernant la réaction de Feulgen, est important. Bien que nos connaissances sur les mécanismes de cette réaction soient encore incomplètes, la confrontation des résultats d'ordre histochimique et biochimique montre une concordance très satisfaisante. Une mise au point complète concernant la chimie du réactif de Schiff et de ses applications a paru récemment (KASTEN, 1960).

L'ARN

est localisé à l'aide de colorants basiques — bleu de toluidine et vert de méthyle-pyronine — en utilisant le test de BRACHET (1953).

Coloration au bleu de toluidine — test de Brachet.

Le bleu de toluidine n'est pas spécifique des acides nucléiques, il colore tous les éléments basophiles, mais sa véritable spécificité dans l'étude des acides nucléiques lui est fournie par le test à la ribonucléase. Les coupes-témoin et les coupes traitées par l'enzyme sont colorées ensemble.

Le tissu est fixé soit au mélange de Serra, soit au liquide de Helly. Les coupes sont colorées 20 minutes par une solution à parties égales de bleu de toluidine à 1 ‰ et de tampon phosphate 0,01 M à pH 4,7. Après rinçage dans le tampon phosphate, les coupes sont passées dans une solution de molybdate d'ammonium à 4 ‰.

— TEST A LA RIBONUCLÉASE.

Nous employons une solution à 0,1 mg par ml d'eau distillée de ribonucléase cristallisée (Worthington, Biochemical Sales Co, New Jersey, U.S.A.). Les coupes séjournent 1 heure à 37°C. dans la ribonucléase, elles sont rincées soigneusement et colorées.

Remarque : Les acides ribonucléiques sont parfois solubles dans l'eau à 37°. Nous contrôlons le test à la ribonucléase en traitant un troisième groupe de préparations par l'eau distillée à 37°, pendant 1 heure, avant de les colorer. VERCAUTEREN (1950) a fait une étude de l'emploi de la ribonucléase et a conclu à la validité de cette technique.

Coloration au vert de méthyle-pyronine (méthode d'Unna-Brachet).

Cette méthode repose sur les propriétés qu'ont l'ARN et l'ADN d'être colorés sélectivement, le premier par la pyronine, le second par le vert de méthyle. KURNICK (1955) montre que ces propriétés sont dues à l'état de polymérisation des chaînes de nucléotides. L'ADN est hautement polymérisé alors que l'ARN se trouve sous forme de macromolécules de polymérisation faible. VERCAUTEREN (1950), en dépolymérisant l'ADN, le colore par la pyronine et inversement POLLISTER et LEUCHTENBERGER (1949) obtiennent la coloration au vert de méthyle d'ARN polymérisé.

Le mésencéphale est fixé par le liquide de Serra pendant 2 heures. Les coupes sont placées pendant 20 minutes dans le colorant :

vert de méthyle (Chroma) purifié au chloroforme .	0,15 g
pyronine (Chroma Gesellschaft, Stuttgart)	0,25 g
alcool 95°	2,5 ml
tampon acétique pH 4,7	q. s. 100 ml

et passées rapidement dans l'alcool absolu avant d'être montées.

Un groupe de préparations est traité par la ribonucléase avant d'être coloré. Un autre groupe de préparations est traité par l'eau distillée à 37° avant d'être coloré.

Remarques : La coloration est faible. Pour la renforcer, nous la faisons précéder d'un traitement par l'acide trichloracétique à 5 % pendant 15 minutes, suivant les conseils de LISON (1953). Cependant, la coloration au vert de méthyle-pyronine a donné, pour notre matériel, des résultats inférieurs à ceux de la coloration au bleu de toluidine.

Des essais de divers fixateurs — Carnoy (KURNICK), formol à 10 % —, et de pH variés (GEROLA et VANNINI, 1948) n'ont pas amélioré les résultats.

La coloration d'Unna-Brachet doit permettre l'identification simultanée de l'ADN et de l'ARN. En fait, LISON (1953) la considère comme une méthode de mise en évidence élective des ribonucléines, KURNICK (1950), au contraire, l'emploie strictement pour l'étude de l'ADN. En accord avec LISON, nous l'avons classée dans les techniques d'étude de l'ARN pour deux raisons : la coloration au vert de méthyle nous a donné des résultats très inférieurs à la réaction de Feulgen ; le test à la ribonucléase, employé aussi bien avec la coloration au bleu de toluidine qu'avec cette coloration, justifie la mise en parallèle des deux techniques.

L'hématoxyline.

Ce n'est pas un colorant spécifique des acides nucléiques, mais l'emploi d'un mordant à l'alun de fer permet la coloration de la chromatine et des structures nucléiques. Nous utilisons l'hématoxyline de Heidenhain et différencions à l'alun de fer. La différenciation plus ou moins poussée met en évidence le nucléole, les corps de Nissl et les chromosomes. Elle est particulièrement précieuse dans l'examen de cellules en mitose. Elle nous permet de contrôler les résultats obtenus par les méthodes précédentes.

B. — *La phosphatase alcaline.*

La phosphomonoestérase ou phosphatase alcaline non spécifique hydrolyse les esters organiques de l'acide phosphorique à un pH voisin de 9. On ne connaît pas son substrat physiologique.

La méthode d'étude consiste à mettre en évidence, non l'enzyme elle-même, mais un des produits résultant de son activité. Nous utilisons la technique de GOMORI (1939) et TAKAMATSU (1939). La phosphatase alcaline, en présence de β -glycérophosphate de sodium et d'ions calcium à pH 9,2, hydrolyse le sel de sodium. L'ion phosphate libéré précipite sous forme de phosphate de Ca au lieu même de l'activité enzymatique. Ce sel incolore est visualisé sous forme de phosphate de cobalt rose, lui-même transformé en sulfure de cobalt noir.

Nous avons fait des essais de divers fixateurs : acétone, alcool glacés. L'alcool permet une meilleure localisation de la phosphatase, mais il détruit une grande partie de son activité. L'acétone, mauvais fixateur, préserve par contre beaucoup mieux l'activité comme l'avait constaté DOYLE en 1953. Nous utilisons la technique de fixation préconisée par PEARSE (1954).

La durée de fixation est de 2 heures. Le tissu est déshydraté à 30 mn d'intervalle dans les bains suivants : — (1) alcool à 95° — (2) alcool absolu — (3) alcool absolu-éther — (4) celloïdine à 1 % et séchage au chloroforme — (5) benzène. Nous incluons à la paraffine à 54° sous vide relatif suivant GOMORI (1952).

RÉACTION ENZYMATIQUE — COLORATION.

Les coupes sont mises en incubation à 37°C. dans le milieu :

β -glycérophosphate de Na 2 %	10 ml
Labo- ratoire Octave Bailly, Montreuil- sous-Bois	10 ml
diéthylbarbiturate de Na 2 %	20 ml
eau distillée	2 ml
chlorure de Ca 2 %	1 ml
sulfate de Mg 2 %	

Les temps d'incubation sont de : 1/2 — 1 — 1 1/2 — 2 et 3 heures et les coupes sont rincées à l'eau courante (l'eau distillée dissout le phosphate de Ca). Les préparations sont traitées par du nitrate de Co à 2 % pendant 5 minutes et rincées à l'eau distillée. Elles sont passées 1 à 2 minutes dans du sulfure d'ammonium à 5 % et rincées à fond.

Remarques : DANIELLI (1946) a montré que des diminutions d'activité atteignant 75 % s'observaient après inclusion à la paraffine. L'inclusion sous vide permet de réduire à 2 heures l'exposition à une température élevée et limite la perte d'activité. Nous avons étudié la phosphatase sur coupes à congélation après fixation de 4 heures au formol neutre à 10 %. L'activité enzymatique est légèrement plus forte. Par contre les images sont moins nettes à cause de l'épaisseur des coupes (20 μ).

La technique de GOMORI permet-elle de révéler la localisation exacte de l'enzyme ? La réaction de GOMORI est du type indirect, l'ion phosphate étant mis en évidence par l'intermédiaire de réactions en cascade.

Glycérophosphate de Na \longrightarrow phosphate de Ca \longrightarrow phosphate de Co \longrightarrow sulfure de Co.

Au cours des étapes intermédiaires, il est toujours possible que des diffusion et des adsorptions ultérieures aient lieu. Deux étapes sont critiques : la fixation doit immobiliser l'enzyme au lieu exact de son activité. C'est un point difficilement contrôlable, on ne peut déceler l'enzyme sur le vivant et les séparations pratiquées par les biochimistes ne sont pas, elles-mêmes, à l'abri d'artefacts de diffusion.

L'histo chimiste ne peut étayer ses résultats sur ceux du biochimiste. La phosphatase alcaline existe sous deux formes, lyo- et desmo-enzymes ; le biochimiste travaille sur les deux alors que l'histo chimiste ne révèle que la dernière.

Le phosphate de Ca ne précipite pas toujours au lieu même de la libération de l'ion phosphate. Le sel de calcium, qui se forme à l'état moléculaire, est soluble. Il précipite sous forme colloïdale lorsque la sursaturation est atteinte. Durant la phase moléculaire, il peut être attiré par des structures ayant une forte affinité pour lui, comme c'est le cas pour les noyaux. Nous devons tenir compte de ces points dans l'interprétation de nos résultats. Quant à la spécificité de la réaction, elle est satisfaisante lorsque l'on a soin d'établir des points de comparaison avec des préparations témoins ayant passé par les divers stades de la technique, mais ayant subi une inactivation préalable de l'enzyme par chauffage, ou n'étant pas entrées au contact de glycérophosphate.

C. — *La succinodéshydrogénase (SDH).*

Elle est le premier chaînon du système succinoxydasique : *in vitro* la SDH réduit des sels de tétrazolium, sels incolores, en formazans colorés. Cette propriété est utilisée pour sa localisation histochemique. La plupart de ces sels précipitent sous forme de cristaux qui augmentent de taille avec le temps (RUTHENBURG et Coll., 1953). Nous avons expérimenté le NNT ou chlorure de (2-2', diphényl-5, 5'-d - (m-nitrophényl) - 3, 3'-(4, 4'-triphénylène) nitronéotétrazolium, (Synthetical Laboratories, Chicago, U.S.A.) qui donne un précipité de formazan très fin permettant une localisation précise de l'enzyme. Nous utilisons la technique de PEARSON (1958), modifiée.

Le mésencéphale est coupé au microtome à congélation sans fixation préalable. Les coupes ont une épaisseur de 60 à 80 μ . Elles sont mises directement dans le substrat :

Succinate de Na 0,1 M	5 ml
N-N' diméthylformamide	5 ml
Tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 . .	5 ml
NNT	10 mg

Le sel de tétrazolium se dissout bien dans la N-N' diméthylformamide. La durée d'incubation est de 2 à 3 heures. Les coupes sont alors fixées au formol neutre à 10 % et montées sur lame à la glycérine.

Remarques : L'épaisseur des coupes n'est pas un inconvénient ; au contraire, l'activité du mésencéphale étant faible, elle permet une meilleure observation des détails fins. Des variations de pH du substrat comprises entre 7 et 7,6 sont sans influence décelable sur l'activité de l'enzyme. Par contre, la température de congélation est très importante. Des coupes sous-congelées ne montraient aucune activité, surcongelées, elles présentaient de gros cristaux de formazan. L'intervalle de tempé-

rature permettant une localisation correcte de l'enzyme est comprise entre -1° et -3°C . (FRIEDE).

La réduction du sel de tétrazolium est spécifique de l'activité SDH. Des substances réductrices se trouvant dans la cellule vivante, telles que le glutathion, la cystéine, l'acide ascorbique, ne peuvent agir à un pH inférieur à 9. Cette réaction est inhibée par chauffage à 80° .

D. — *L'acétylcholinestérase.*

L'acétylcholinestérase (AChE) et la cholinestérase s.s. (ChE) hydrolysent toutes deux des esters de la choline. La première hydrolyse l'ACh à des concentrations faibles, la seconde agit sur des esters à longue chaîne carbonée sur lesquelles l'AChE a peu d'action. Leur distinction repose sur le choix du substrat utilisé. En histochimie, on étudie l'activité des cholinestérases en présence, soit d'acétylthiocholine pour l'identification de l'AChE, soit de butyrylthiocholine pour celle de la ChE.

Nous utilisons la technique de KOELLE et FRIEDENWALD (1949) modifiée par GEREBTZOFF (1953-1956) : en présence d'acétylthiocholine et d'un sel de cuivre, dans des conditions de milieu favorables, l'AChE hydrolyse l'acétylthiocholine. La thiocholine libérée réagit avec le cuivre et donne un mercaptan relativement insoluble que l'on révèle par du sulfure d'ammonium.

Le mésencéphale est fixé dans du formol neutre à 10 % pendant 4 heures. La pièce est coupée à 20μ , les coupes sont refixées pendant 30 minutes dans le formol et lavées deux fois durant 30 minutes. Elles sont mises à incuber à 37° en présence de substrat :

Tampon acétate 0,1 M	2,5 ml
Eau distillée	1,9 ml
Glycocolle 3,75 %	0,1 ml
Acétate de cuivre 0,1 M	0,1 ml
Solution d'Acétylthiocholine ou de Butyrylthiocholine	0,4 ml

Les solutions d'acétyl- ou de butyrylthiocholine sont préparées de la façon suivante :

Iodure d'acétylthiocholine (Hoffmann Laroche, Bâle)	15 mg
ou iodure de butyrylthiocholine	18 mg
Eau distillée	0,78 ml
Acétate de cuivre 0,1 M	0,26 ml

Centrifuger 10-15 mn à 3 500-4 000 tours/mn

Les coupes sont prélevées au bout de 30 minutes, 1, 2, 3, 18 heures. Après un lavage rapide, elles sont plongées pendant quelques secondes dans du sulfure d'ammonium à 5 % et lavées longuement. Elles sont déshydratées et montées au baume du Canada.

L'activité de l'ACHé est fonction du pH du milieu, l'optimum se situant aux environs du pH 7. Jusqu'au *stade* 38, le mésencéphale a une activité faible ; pour la déceler, nous travaillons dans des conditions optimales, à pH 6,8. Dans les derniers stades, la réaction est forte et nous observons des aiguilles de diffusion dues à des précipités en cristaux. Pour y remédier, nous abaissons le pH à 6,2 ; l'activité est légèrement réduite et les images sont plus nettes.

E. — *Commentaire général sur les méthodes histochimiques.*

Les méthodes histochimiques que nous avons employées ne sont pas quantitatives. Pourtant, en faisant varier le pH (cas de l'ACHé), en tenant compte des durées d'incubation ainsi que de l'intensité de la réaction, il est possible d'étudier de façon très correcte l'évolution d'une réaction, au cours du développement ; l'appréciation en est subjective, mais elle n'en demeure pas moins satisfaisante lorsque nous la comparons à nos résultats biochimiques. La condition indispensable pour que cette appréciation ait un sens est de travailler dans des conditions rigoureusement identiques.

F. — *Les neurofibrilles.*

Une étude concernant la différenciation du mésencéphale manquerait d'unité si l'on omettait d'y inclure la différenciation neurofibrillaire. L'étude des neurofibrilles se justifie aussi bien au point de vue morphologique (ces structures dessinent de façon précise les connexions et rapports des différentes cellules) que du point de vue physiologique (leur apparition est un critère sûr de la différenciation neuroblastique).

La mise en évidence des neurofibrilles se fait par imprégnation métallique à partir de sels de molybdène, d'or ou d'argent. Parmi les nombreuses méthodes proposées, la plus couramment employée est celle de CAJAL (1935) qui réalise une imprégnation sur bloc par une solution aqueuse de nitrate d'argent. Le complexe argentique formé est réduit par l'action d'un révélateur photographique, l'acide pyrogallique ou l'hydroquinone. Il se forme un dépôt d'argent métallique au niveau des neurofibrilles.

Le mésencéphale est fixé 6 à 8 jours (temps le plus court pour les stades précoces, le plus long pour les stades d'éclosion ou qui la précèdent) dans le mélange à parties égales de pyridine et d'eau distillée. Puis la pièce est mise dans la pyridine pure durant 18 à 24 heures et lavée plusieurs heures ; elle est ensuite passée 24 heures dans l'alcool à 90° et séchée au buvard.

L'imprégnation dans une solution de nitrate d'argent à 1,5 % est faite à 37° et dure 4 à 5 jours ; la pièce est ensuite lavée une minute à l'eau distillée. La réduction se fait à froid pendant 24 heures :

acide pyrogallique	1 g
eau	100 ml
formol	5 ml

Le mésencéphale est rincé, déshydraté et inclus dans la paraffine. Les coupes sont faites à 5 μ .

Cette formule est strictement réservée à l'étude de la neurogenèse. HELD (cité par BERTRAND, 1930) recommande l'emploi de la pyridine comme étant le fixateur de choix dans l'étude neurofibrillaire des embryons. Mais alors qu'il utilise la pyridine pure, CAJAL préfère une pyridine aqueuse qui rétracte moins les pièces.

III. - Description succincte des stades du développement du Mésencéphale et de la différenciation neurofibrillaire

Afin de faciliter la compréhension de nos résultats et en particulier des résultats histochimiques, nous devons donner un aperçu du développement du mésencéphale et surtout de la région dont nous nous sommes occupés principalement, les lobes optiques. Ceux-ci représentent un matériel très favorable par suite de l'arrangement des cellules et des fibres nerveuses en couches régulières. L'apparition de différenciations biochimiques dans ces couches nous oblige aussi à décrire la genèse d'une différenciation morphologique, les neurofibrilles, au cours du développement de ces couches. Alors que la première partie de cet exposé repose sur des observations incontestables d'autres auteurs, nous avons cherché à contrôler, autant que possible, par des recherches personnelles, l'évolution de la neurofibrillogénèse.

A. — *Le développement du mésencéphale de l'embryon de Poulet.*

La région dorsale du mésencéphale des oiseaux est un centre visuel important, constituant le tectum opticum, divisé en deux parties symétriques, les lobes optiques ou *corpora bigemina*, par un sillon médian dont le fond est occupé par la lame commissurale (Fig. 1). La région ventrale forme le tegmentum. Le canal épendymaire est réduit à un isthme, l'aqueduc de Sylvius, qui relie le III^e ventricule au IV^e ventricule.

Le mésencéphale des oiseaux est caractérisé par le développement important des lobes optiques. Ce n'est que chez les Téléostéens que l'on trouve un développement comparable. Les connexions afférentes du tectum se font en majorité avec la rétine, le tectum étant le point

d'aboutissement des fibres du nerf optique. Les connexions efférentes se font avec le striatum. Ainsi les lobes optiques représentent un important relais optico-moteur. Les centres moteurs de l'œil sont localisés dans le tegmentum (noyaux du nerf oculo-moteur commun et du nerf pathétique).

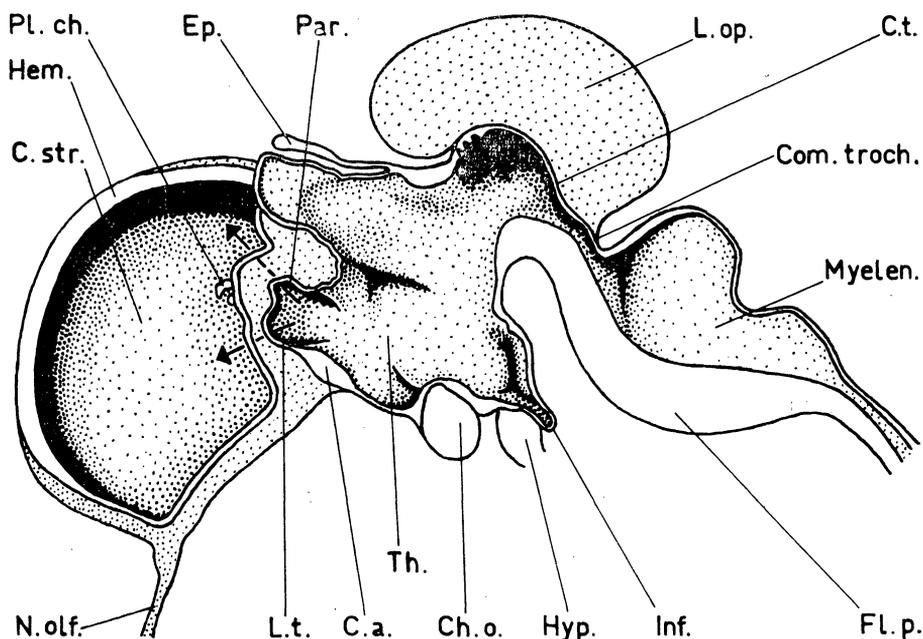


FIGURE 1

Coupe sagittale de l'encéphale d'un embryon de Poulet de huit jours (stade 34)
(d'après HAMILTON)

Abréviations : C. a., commissure antérieure - C. t., commissure tectale - C. str., corps striés - Ch. o., chiasma optique - Com. troch., commissure trochléaire - Ep., épiphyse - Fl. p., flexure pontique - Hem., hémisphères cérébraux - Hyp., hypophyse - Inf., infundibulum - L. op., lobes optiques - L. t., lame terminale - Myelen., myélen. - N. olf., nerf olfactif - Par., paraphyse - Pl. ch., plexus choroides - Th., thalamus.

Le mésencéphale se différencie précocement (*stade 11* de HAMILTON, correspondant à 40-45 heures d'incubation). C'est une vésicule aux parois minces ; les plaques alaires se soudent en une lame unique, le tectum opticum, les plaques basales forment le tegmentum. La cavité ventriculaire est large.

Bientôt, la lame alaire s'évagine et fait saillie à la surface de l'encéphale. Au *stade 26* de HAMILTON (4 1/2 - 5 jours), un sillon médian, partant de la partie postérieure, divise le tectum en deux

parties symétriques, les lobes optiques. Les cavités des lobes optiques forment les ventricules optiques, séparés par la lame commissurale.

Cette partie du développement correspond à la première phase de différenciation de l'encéphale définie par KUHLENBECK (1936) et ROMANOFF (1960, p. 235) : « The establishment of relatively simple structures and their evolution into the various morphological divisions of the brain ».

La seconde phase du développement, qui débute au 5^e ou 6^e jour de l'incubation (*stade* 29 environ), représente une période de multiplication et de différenciation. Les lobes optiques sont séparés par une lame commissurale mince formée par la commissure tectale et le noyau mésencéphalique du trijumeau (TELLO, 1923). Cette lame s'affaisse dans la cavité ventriculaire et entre presque en contact avec le tegmentum. Dans la région médiane, les ventricules optiques se réduisent à un étroit canal qui deviendra l'aqueduc de Sylvius.

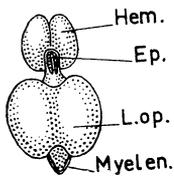
Aux environs du 7^e ou 8^e jour du développement (*stades* 31-33), les lobes optiques s'écartent dans la partie antérieure du mésencéphale, alors qu'ils restent en contact dans la partie postérieure (ceci est bien visible au *stade* 35, soit 9 jours). Leurs axes forment un angle de 90° ouvert vers l'avant. La rotation des lobes se poursuit de sorte qu'au 12^e jour (*stade* 40), leur axe est perpendiculaire à celui de l'encéphale (Fig. 2).

Au cours de cette phase, de profonds remaniements ont lieu dans la cytoarchitecture du mésencéphale et plus particulièrement dans celle des lobes optiques. Durant toute la première phase, la structure du mésencéphale demeure celle du tube neural telle qu'elle a été décrite par HAMBURGER et LEVI-MONTALCINI (1955). La paroi est formée initialement par une simple couche de cellules épithéliales cylindriques. C'est à partir de ces cellules ectodermiques indifférenciées que vont se développer, au cours de la seconde phase, les cellules nerveuses et la macroglie.

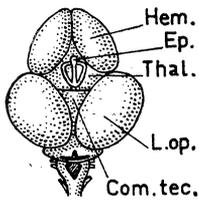
C'est ainsi qu'au *stade* 26 (4 1/2 - 5 j.), la paroi des lobes optiques montre déjà plusieurs zones :

- une zone profonde épendymaire ou épithélium neural germinatif ;
- une zone moyenne ou couche du manteau, riche en cellules indifférenciées, résultant de la division et de la migration de cellules provenant de la première zone, la migration commençant très tôt, vers la 52^e heure de l'incubation (TELLO, 1923). Elle occupe la position de la future substance grise.
- une zone périphérique ou marginale, dépourvue de noyaux cellulaires, dans laquelle se développera la substance blanche.

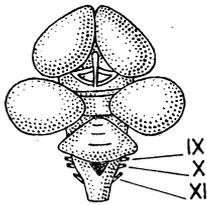
a



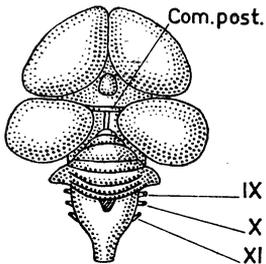
c



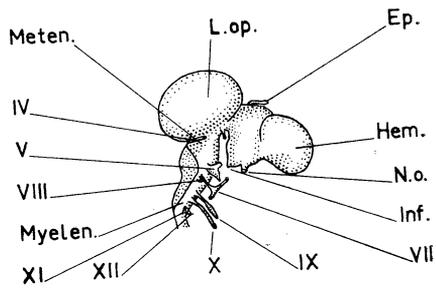
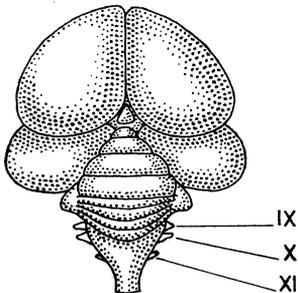
e



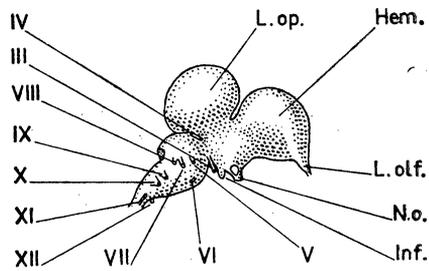
g



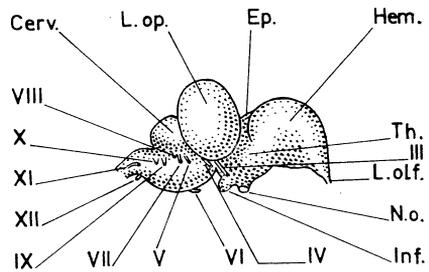
i



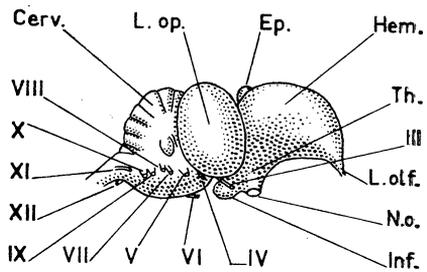
b



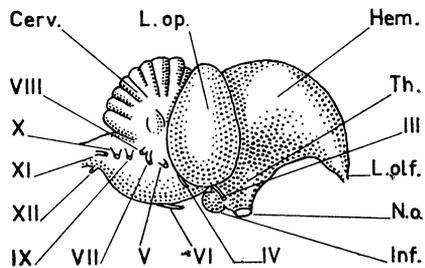
d



f



h



j

Les cellules filles, provenant de la division de cellules de l'épithélium germinatif (HIS, 1889-1904) ou, pour d'autres auteurs (SAUER, 1935 ; HAMBURGER, 1948 ; SAUER et CHITTENDEN, 1959 ; SIDMAN et coll., 1959), de cellules de la couche du manteau, évoluent en deux directions : les unes, les spongioblastes, migrent à l'intérieur du manteau où elles donneront les cellules de la névroglie ; les autres constituent les neuroblastes, première forme de différenciation de la cellule nerveuse.

Jusqu'au stade 27-28 (5 - 5 j. 1/2), on observe cette structure simple dans le mésencéphale, aussi bien dans le tectum que dans le tegmentum. Vers le 5^e jour d'incubation, la seconde phase de différenciation débute. Cette phase correspond à l'établissement de la cytoarchitecture définitive du mésencéphale. Dans les lobes optiques, elle aboutit à la formation de nombreuses strates concentriques, les unes riches en cellules, les autres riches en fibres.

On trouve dans la littérature de nombreuses descriptions des lobes optiques de l'embryon de Poulet. STIEDA (1868) y décrit 14 couches, BELLONCI (1888) en voit 11, RAMON Y CAJAL (1891) en distingue 15. HUBER et CROSBY (1929) regroupent les couches du tectum en 6 strates, l'une d'elles comportant 6 sous-strates. Ces nombreux résultats illustrent bien la complexité de l'architecture du tectum. VAN GEHUCHTEN (1892) regroupe les strates en 3 couches principales :

— une zone externe constituée des 7 premières couches de Cajal, formée surtout par les terminaisons des fibres du nerf optique ;

— une zone intermédiaire de substance grise, riche en neurones. Elle groupe les couches 8 à 12 de Cajal ;

— une zone interne de substance blanche qui réunit les 3 dernières couches de Cajal.

FIGURE 2
(d'après ROGERS et Coll.)

- a - b. — Vues dorsale et latérale de l'encéphale d'un embryon de Poulet au stade 30 (6 jours).
c - d. — Vues dorsale et latérale de l'encéphale d'un embryon de Poulet au stade 34 (8 jours).
e - f. — Vues dorsale et latérale de l'encéphale d'un embryon de Poulet au stade 36 (10 jours).
g - h. — Vues dorsale et latérale de l'encéphale d'un embryon de Poulet au stade 39 (13 jours).
i - j. — Vues dorsale et latérale de l'encéphale d'un embryon de Poulet au stade 43 (17 jours).

Abréviations, cf. fig. 1 : Cerv., cervelet - Com. post., commissure postérieure - L. olf., lobes olfactifs - Met., métencéphale - N. o., nerf optique - Thal., thalamus - III - XII, nefs crâniens.

Le développement de la stratification a été étudié par TELLO (1923). Elle résulte de la différenciation et de la migration des neuroblastes dans la couche du manteau, ainsi que de la différenciation de prolongements cellulaires qui vont constituer les couches de fibres nerveuses.

Vers la 72^e heure, des fibres apparaissent à la périphérie, tout d'abord dans le tegmentum, puis dans le tectum. Ces dernières sont destinées à former ultérieurement la couche fibreuse profonde du tectum (*stratum album centrale, stratum medullare profundum*) ou 14^e couche de Cajal.

Vers la fin du 5^e jour (*stade 29*), les premières fibres de la rétine atteignent les lobes optiques (Fig. 3). En même temps, les cellules de

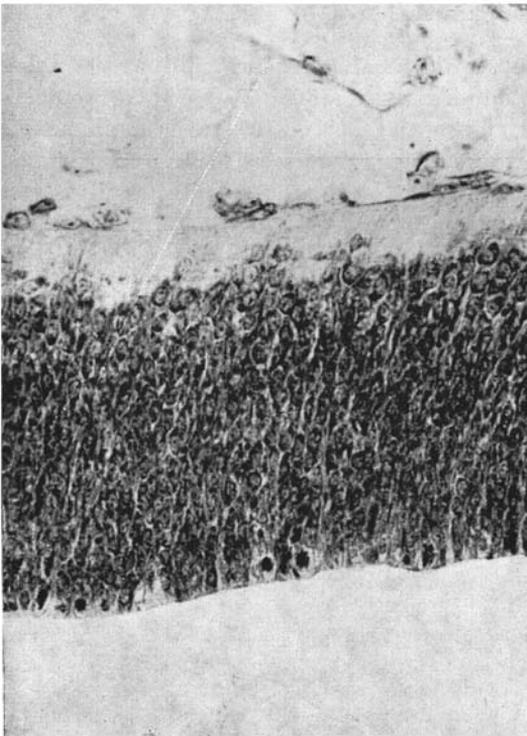


FIGURE 3

Lobe optique de l'embryon de Poulet. Stade 26 (5 jours). Coupe frontale au niveau du tectum. Bleu de toluidine. $\times 80$.

la zone externe de la couche du manteau, directement au contact de la couche fibreuse, se différencient en neuroblastes. Les caractères de cette différenciation apparaîtront clairement lors de l'étude de la neurofibrillogénèse. Le processus débute à la partie antérieure et ventrale et se poursuit latéralement et en arrière au 6^e jour.

A ce moment (*stade 30*), un second processus s'amorce : c'est la migration de cellules indifférenciées ou partiellement différenciées de la couche du manteau vers la périphérie. Ces cellules traversent la couche fibreuse et vont constituer une couche neuroblastique externe

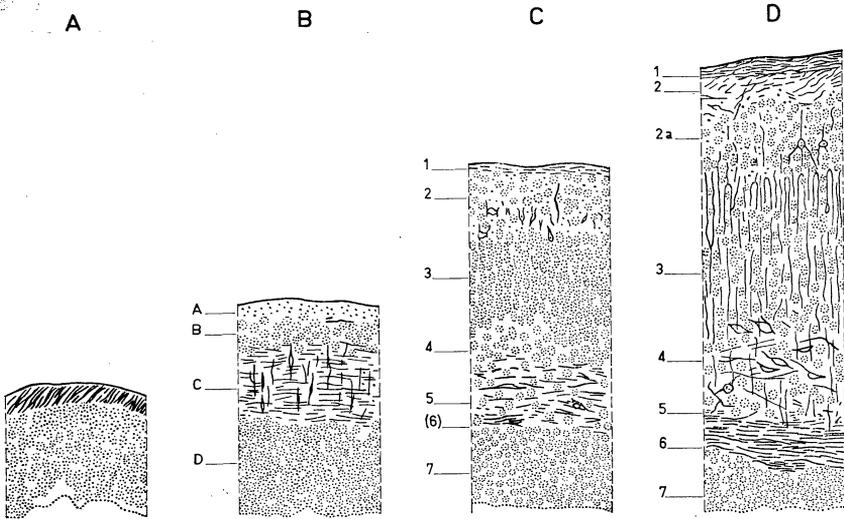


FIGURE 4

(d'après ROMANOFF, 1960)

Développement de la stratification dans les lobes optiques.

A, 5 jours ; B, 6 jours ; C, 8 jours ; D, 10 jours.

(Fig. 4, B). La couche fibreuse semble s'enfoncer alors dans la paroi du tectum. A ce stade, nous divisons les lobes optiques en 4 couches étagées de la périphérie vers la profondeur :

- couche A : couche des fibres du nerf optique ;
- couche B : couche neuroblastique externe ;
- couche C : couche fibreuse profonde ;
- couche D : couche neuroblastique interne, sous-tendue par l'épendyme.

Les trois couches A, B, C, correspondent aux trois zones définies par VAN GEUCHTEN (1892) au 12^e jour de l'incubation. La stratification se poursuit à l'intérieur de ces zones. Le détail de la différenciation des couches sera donné dans notre étude de la différenciation neurofibrillaire. Au 12^e jour, l'architecture du tectum sera sensiblement celle que l'on observe à l'éclosion (Fig. 5). Nous utilisons, pour désigner les différentes couches, la nomenclature établie par RIS (1899) et reprise par FEENEY et WATTERSON (1946).

La couche des fibres rétiniennes englobe les sept premières couches de Cajal. La bandelette optique constitue la couche 1. Les fibres de

cette couche, orientées tangentiellement à la surface, de l'avant vers l'arrière, se courbent à angle droit et s'enfoncent dans la paroi des lobes optiques où elles se terminent en arborisations, à des niveaux différents, déterminant les strates 2 α - 2 β - 2 γ - 2 δ . Ces arborisations axoniques entrent en contact avec les ramifications dendritiques des cellules de la couche intermédiaire. Ces zones plexiformes ne sont pas dépourvues de cellules. Les couches les plus externes 2 α et 2 β ont une densité cellulaire moyenne, 2 γ est riche en neurones, 2 δ par contre est presque acellulaire. Les axones de ces cellules s'enfoncent dans la couche intermédiaire, certains atteignent la substance blanche centrale.

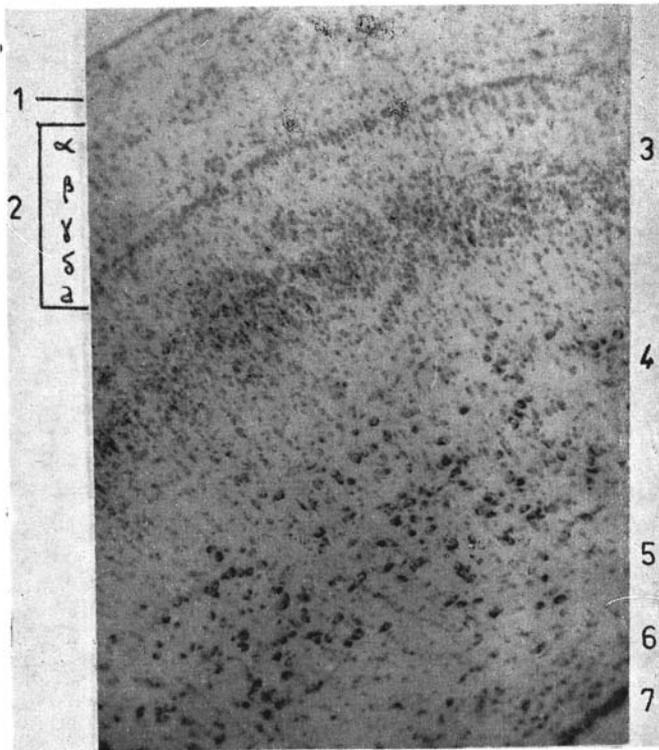


FIGURE 5

Lobe optique de l'embryon de Poulet, Stade 45 (29 jours).
Coupe frontale au niveau du tectum. Bleu de toluidine.
× 80.

La couche des cellules nerveuses optiques est formée de 2 strates : 2a et 3 (couches 8 à 12 de Cajal). La couche 2a est mince, formée de petits neurones à cylindraxes courts qui s'enfoncent dans la substance grise et se terminent en de nombreuses arborisations. La couche 3 est

épaisse. Dans le tiers externe, les cellules sont dispersées ; R15 en fait une zone moléculaire. Les 2/3 profonds de la couche sont très riches en cellules.

La zone interne de substance blanche groupe les trois dernières couches de Cajal (13 à 15). La strate externe (couche 4) est formée de larges cellules ganglionnaires. La couche 5 correspond au *stratum medullare profundum* ; elle est presque acellulaire. Elle est au contact d'une couche de substance grise centrale (couche 6).

Les lobes optiques sont bordés par une couche épendymaire mince (couche 7) dans laquelle toute activité mitotique a disparu.

B. — *La neurofibrillogénèse.*

1. RÉSULTATS.

TELLO (1923) et FILOCAMO (1960) décrivent l'apparition de neurofibrilles, et donc la différenciation des cellules du tube neural en neuroblastes, dès le *stade* 20 (70-72 heures).

Nous avons commencé nos observations au début de la seconde phase de différenciation de KUHLENBECK.

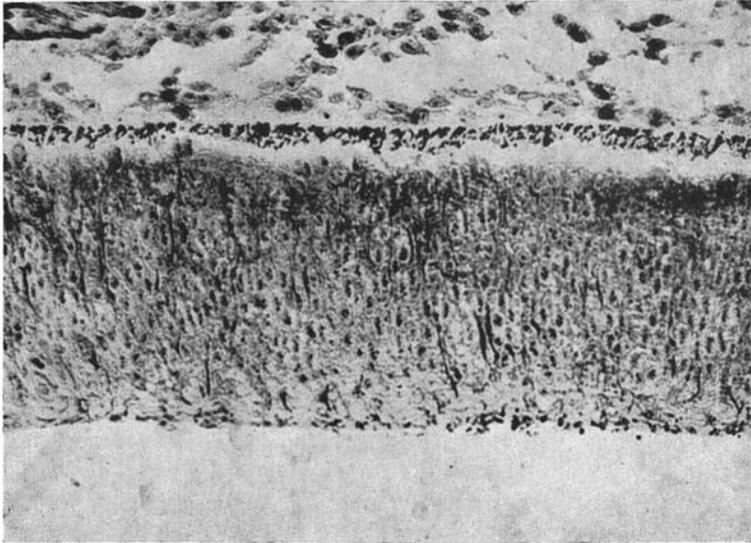


FIGURE 6

Lobe optique de l'embryon de Poulet. Stade 26 (5 jours). Coupe frontale au niveau du tectum. Neurofibrilles. $\times 150$.

Au *stade* 25 (4 j. 1/2), quelques cellules de la zone marginale du tectum aussi bien que du tegmentum possèdent déjà une affinité pour l'argent (Fig. 6). Ce sont des neuroblastes piriformes dont les axones sont dirigés vers la base du mésencéphale où ils rejoignent la voie longitudinale tectothalamique. Quelques courtes neurofibrilles entourent le noyau et se prolongent dans le neurite. La couche fibreuse superficielle qui entoure le mésencéphale possède une affinité pour l'argent. Pour LEGHISSA (1958), les fibres périphériques appartiennent à un faisceau afférent de la sensibilité générale. Il nous semble, avec TELLO et LEVI-MONTALCINI (cités par FILOGAMO, 1960) et ce dernier auteur, que ces fibres forment une voie efférente du mésencéphale.

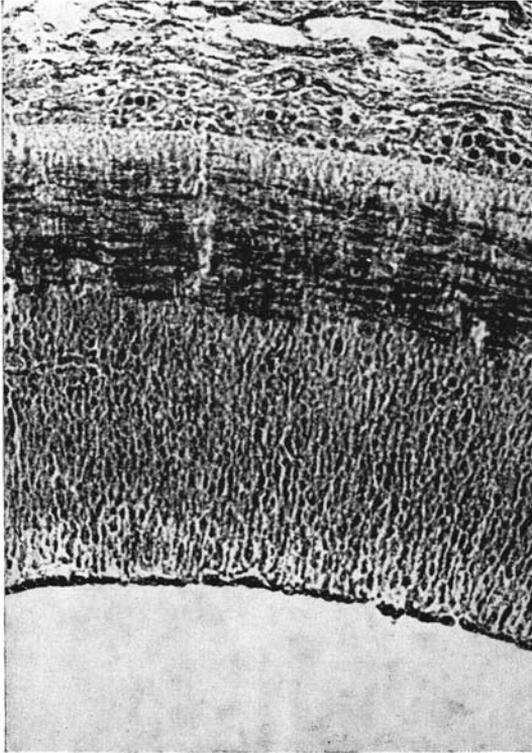


FIGURE 7

Lobe optique de l'embryon de Poulet. Stade 30 (6 jours). Coupe frontale au niveau du tectum Neurofibrilles. $\times 150$.

A partir du *stade* 28-29 (5 1/2 - 6 jours), la couche fibreuse marginale (*stratum medullare profundum*) s'épaissit et son affinité pour l'argent s'accroît. En même temps, elle se trouve envahie par des cellules de la couche neuroblastique interne. Il s'agit de neuroblastes de la région externe de cette couche, mais également de cellules non différenciées.

Au *stade* 30 (6 j. 1/2), les neuroblastes et les cellules non différenciées, qui ont traversé le faisceau fibreux, se concentrent à sa périphérie où ils forment une couche cellulaire externe (Fig. 7) (Cf. fig. 4 B). Cette couche est, elle-même, limitée par une zone étroite acellulaire, le voile marginal.

— Le voile marginal (couche A) est composé, dans la partie antérieure des lobes optiques, de fibres du nerf optique. Ces fibres ont une forte affinité pour l'argent.

— La couche cellulaire externe (couche B) est formée, dans sa partie profonde, de cellules sans caractère de différenciation, et, dans sa partie périphérique, de neuroblastes de type bipolaire encore peu différenciés.

— La couche fibreuse interne (couche C) a une forte affinité pour l'argent. Des cellules des deux types précédemment décrits, neuroblastes et cellules non différenciées, la parsèment.

— La couche cellulaire interne (couche D) n'est plus composée que de cellules indifférenciées et de cellules en mitose dans la région paraventriculaire. Les neuroblastes localisés dans la zone externe, aux stades précédents, ont migré dans les couches voisines. C'est uniquement une couche germinative.

Jusqu'au *stade* 33 (7 1/2 - 8 j.), l'aspect reste sensiblement le même ; toutefois, les couches s'épaississent, le nombre des neuroblastes augmente à la périphérie de la couche B.

Au *stade* 34 (8 jours), la stratification se poursuit ; il apparaît deux couches nouvelles, la première à la limite entre A et B, la seconde en C (Cf. Fig. 4, C).

— La couche 1 provient de l'épaississement du voile marginal, envahi par les fibres du nerf optique. Cette zone est dépourvue de cellules, les neurites ont une réaction argentique positive.

— Une couche 2 s'est formée par migration de cellules toutes indifférenciées de la couche neuroblastique externe. Cette zone est mince.

— La couche 3 correspond à la couche neuroblastique externe (précédemment nommée couche B). Elle a conservé sensiblement son aspect. Les neuroblastes sont localisés en majorité à la limite entre les couches 2 et 3. Quelques cellules de la région profonde commencent à se différencier : les neurofibrilles enveloppent le noyau et s'étendent dans les neurites.

— Une couche 4 apparaît à la périphérie de la couche fibreuse interne. Elle est composée de cellules qui avaient envahi le faisceau fibreux. Ces cellules sont assez dispersées, mais le pourcentage de

neuroblastes est plus élevé que dans les autres couches et la différenciation est plus avancée : le réseau de neurofibrilles est très dense dans les corps cellulaires.

— La couche 5 désigne le faisceau de fibres profondes à forte réaction argentique. On y observe encore de nombreuses cellules à divers stades de différenciation. Une zone étroite au contact de la couche germinative est dépourvue de fibres ; elle deviendra plus tard la couche 6. On y observe, dans la région médiane du tectum, de grosses cellules rondes très différenciées : ce sont les cellules du noyau mésencéphalique du trijumeau. TELLO (1923) et P. CAJAL (1943) décrivent ces cellules dès le *stade* 17.

— La couche 7 désigne la couche germinative. Elle s'est amincie et ne présente aucune affinité pour l'argent.

Au *stade* 35 (9 jours) et aux stades suivants, une stratification apparaît dans les couches 1 et 2, que VAN GEHUCHTEN définit comme « couche des fibres rétinienne » (Cf. Fig. 4, D). Cette stratification résulte de deux phénomènes : la migration centrifuge de groupes de cellules issues des couches plus profondes, et le développement centripète des arborisations terminales des fibres du nerf optique. Ces fibres, qui s'étendaient à la surface des lobes, prennent brusquement une direction perpendiculaire, s'enfoncent dans la paroi tectale où elles se terminent à des niveaux différents, sans dépasser la limite interne de la couche 2.

— La couche 2 s'épaissit, on y distingue deux zones : une externe dépourvue de cellules et envahie par les arborisations des fibres rétinienne (couche 2 s.s.), une interne, riche en cellules indifférenciées, avec quelques neuroblastes (couche 2a).

— La couche 3 elle-même montre deux parties distinctes : une externe à cellules dispersées mais bien différenciées, c'est la zone moléculaire de RIS, et une interne très épaisse. La densité cellulaire y est élevée mais la différenciation faible. Cette couche est traversée dans toute son épaisseur par les axones des cellules de la couche 2a, en transit vers la couche 5.

— La couche 4 est très différenciée, c'est une zone ganglionnaire à gros neuroblastes multipolaires.

— Les autres couches n'ont pas subi de changements.

Au *stade* 37 (11 jours), la stratification s'accroît dans la couche des fibres rétinienne (Fig. 8). La couche 2 s.s. est divisée en 3 strates :

- une couche 2 (α β) à cellules dispersées peu différenciées ;
- une couche 2 γ , cellulaire, mince, à faible affinité argentique ;
- une couche 2 δ , encore peu visible ; c'est plutôt une zone de

transition avec la couche voisine 2a, une étroite bande dépourvue de cellules.

La couche de substance grise n'a sensiblement pas changé, la différenciation cellulaire a fait quelques progrès dans la couche 3.

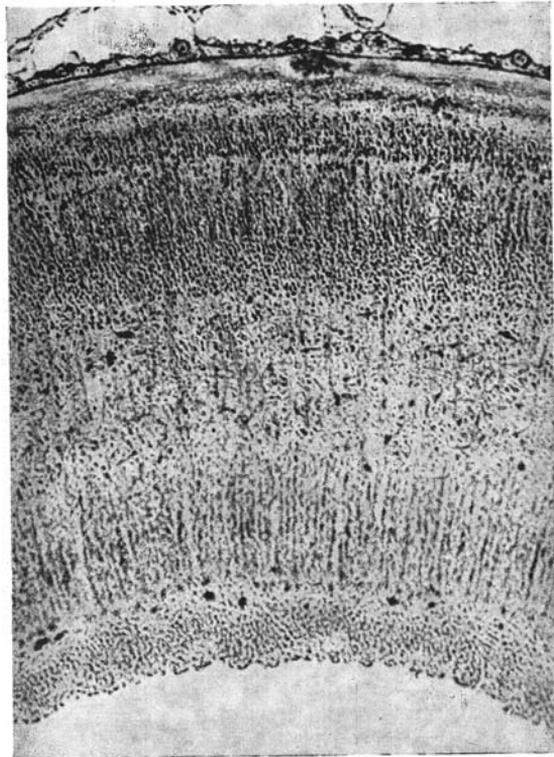


FIGURE 8

Lobe optique de l'embryon de Poulet. Stade 37 (11 jours). Coupé frontale au niveau du tectum Neurofibrilles. $\times 90$.

La couche 4 poursuit sa différenciation. Dans la couche 5, le nombre des cellules en migration a diminué, ceci résultant de l'arrêt de l'activité mitotique de la couche germinative.

Au stade suivant (*stade 38 - 12^e jour*), les couches 2 α et 2 β s'individualisent (Fig. 9). 2 α est pauvre en cellules ; elle est formée par le 1^{er} niveau d'arborisations des fibres nerveuses optiques. 2 β correspond à un 2^e niveau d'arborisation ; sa densité cellulaire est un peu plus grande. Elle possède des neurones d'association dont les prolongements cytoplasmiques s'étalent dans le plan de la couche. 2 γ est plus différenciée, de nombreuses cellules ayant une affinité plus grande pour l'argent. 2 δ est encore mal individualisée.

Dans les couches suivantes, la différenciation progresse régulièrement : le nombre des cellules ayant une affinité pour l'argent augmente, la densité des neurofibrilles dans les corps cellulaires et les prolongements protoplasmiques croît. Dans la couche 5 subsistent quelques cellules indifférenciées mais pas de neuroblastes. Les cellules de la couche 6, qui vient d'apparaître, commencent à se différencier.

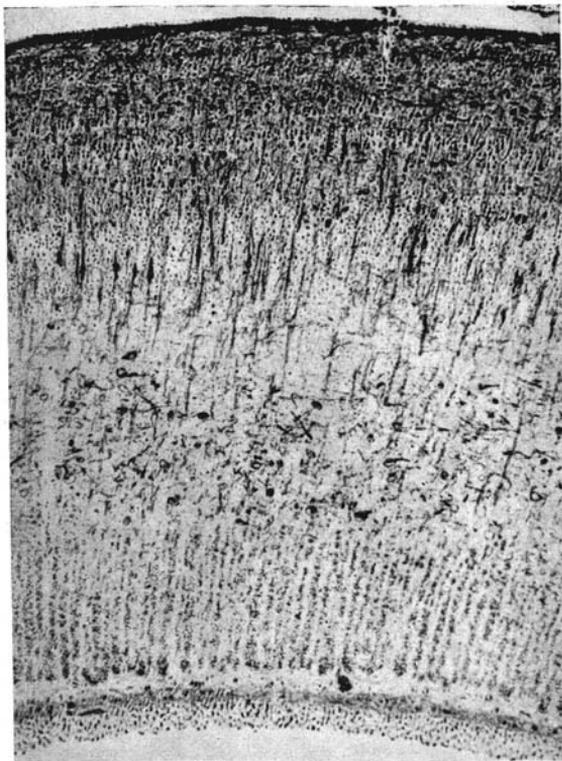


FIGURE 9

Lobe optique de l'embryon de Poulet. Stade 40 (14 jours). Coupe frontale au niveau du tectum. Neurofibrilles. $\times 90$.

A partir de ce stade, l'aspect des lobes optiques demeure sensiblement identique, seuls les caractères de différenciation s'accroissent.

2. DISCUSSION.

L'apparition précoce des neurofibrilles dans le cytoplasme des cellules les plus externes de la paroi mésencéphalique est le premier caractère de différenciation morphologique que l'on observe. LEVI (1925) considère leur présence comme un critère sûr pour reconnaître le protoplasme neuronique. Elle indique l'évolution des cellules cylindriques de l'épithélium neural, les médulloblastes, en neuroblastes

ty piques, définis par HAMBURGER et LEVI-MONTALCINI (1950, p. 132) comme « cells which show definite characteristics of nerve cells, such as an affinity to silver, but which are structurally incomplete, non functional, and not yet located at their terminal positions ».

A ce propos, il nous semble intéressant de nous arrêter un peu sur le processus de migration cellulaire, signalé à plusieurs reprises lors de cette étude de l'évolution de l'architecture des lobes optiques. SAUER (1935) a bien étudié la migration cellulaire dans le tube neural en général. D'après lui, la cellule germinative ne correspondrait pas, comme le prétendait HIS (1889), à un type spécial de cellule sans cesse en mitose, mais représenterait une phase d'activité mitotique des cellules du manteau. La cellule quitterait alors la zone du manteau, migrerait en direction centripète, et se diviserait lorsqu'elle aurait atteint la zone épendymaire. HAMBURGER (1948) soutient cette interprétation et précise que les cellules-filles issues de la division des cellules germinales retournent à l'intérieur de l'épithélium neural.

La migration centrifuge est un caractère général. Les cellules en migration ne sont pas toutes au même stade de différenciation. C'est ainsi qu'au *stade* 30, dans la zone de transit que représente la couche fibreuse profonde (couche C), on observe des cellules ayant déjà une affinité pour l'argent, cellules neuroblastiques qui, dans les stades précédents, étaient localisées dans la zone marginale périphérique, et également des cellules tout à fait indifférenciées qui gagnent la couche neuroblastique externe. La plupart de ces neuroblastes arrêteront leur migration à la périphérie de la couche C et formeront la couche ganglionnaire (couche 4), quelques-uns d'entre eux seulement gagnant la couche B. Inversement, la plupart des médulloblastes poursuivent leur migration jusqu'à la couche neuroblastique externe, quelques-uns d'entre eux s'arrêtant à la couche 4.

A partir du *stade* 30, caractérisé par la présence des 4 couches A - B - C - D, la migration s'effectue par groupes de cellules, pour la plupart au même stade de différenciation, qui formeront des strates cellulaires dans la zone externe. Nous n'insisterons pas sur ces phénomènes, une excellente mise au point concernant la migration ayant été écrite par HAMBURGER et LEVI-MONTALCINI (1950).

Par contre, nous pensons que le problème des neurofibrilles, sur lequel nous avons basé notre discussion, mérite que l'on s'attarde. Si leur existence n'est plus actuellement mise en doute, leur aspect, dans la cellule vivante, ne correspond vraisemblablement pas à l'image que nous en donne la cellule nerveuse fixée et imprégnée à l'argent. Il s'agirait d'une organisation de la substance protéique qui renfermerait un colloïde orienté, la substance neurofibrillaire. Les neurofibrilles

seraient de dimension submicroscopique, correspondant aux neurofilaments observés au microscope électronique par PALAY et PALADE (1955) de ROBERTIS et BENNETT (1955) : structures d'un diamètre de 60 à 100 Å et de longueur indéfinie. Lors de la fixation, ces neurofilaments s'agrègeraient ou s'accoleraient, donnant les neurofibrilles visibles au microscope ordinaire dans les préparations histologiques à l'argent.

Des études de fibres géantes de Calmar au microscope électronique ont permis de distinguer deux types de filaments, les plus minces de 100 Å de diamètre, correspondant aux neurofilaments, d'autres d'une épaisseur de 200 à 300 Å, étant désignés sous le terme de neuroprotofibrilles. PALAY et coll. (1955) assimilent ces dernières au réticulum endoplasmique ou plus précisément à une différenciation spéciale du réticulum endoplasmique.

Bien qu'elles soient étudiées depuis plus d'un siècle, la signification des neurofibrilles demeure inconnue. De nombreux neurophysiologistes considèrent que le matériel neurofibrillaire ne joue aucun rôle dans la conduction nerveuse. Pourtant, d'après de ROBERTIS (1960), il ne semble pas impossible que les processus de croissance de l'axone soient liés à la formation et à la migration des neurofibrilles. On émet également l'hypothèse que le matériel fibrillaire ou tubulaire serait le vecteur de systèmes enzymatiques ou d'autres substances essentielles intervenant dans la transmission nerveuse au niveau des synapses.

IV. - L'Azote total tissulaire

1. RÉSULTATS.

Les mesures de l'azote total du tissu à un stade donné sont rapportées au mésencéphale d'une part, à l'unité de poids frais du mésencéphale, le milligramme, d'autre part.

Les résultats sont exposés dans le tableau 1 et schématisés dans les graphiques 1 et 2. Chaque chiffre correspond à la moyenne des mesures effectuées sur dix embryons au moins.

Chez l'embryon, au *stade* 28 (5 jours), la quantité d'azote évaluée est de l'ordre de 0,219 mg : un jour après l'éclosion, cette quantité est de l'ordre de 3,869 mg, soit une croissance approximative de 18 fois.

Lorsque l'on considère la courbe représentant la quantité d'azote du mésencéphale, on observe une augmentation régulière au cours de tout le développement ; alors que l'on observe une augmentation régulière du poids frais du mésencéphale jusqu'au *stade* 43, à partir du *stade* 44, celui-ci tend à se stabiliser.

Ainsi, jusqu'au *stade* 43, le rapport entre l'azote total et le poids frais du tissu est donc constant. A partir du *stade* 44, l'azote total continuant à augmenter alors que le poids frais reste le même, le rapport entre ces deux données augmente.

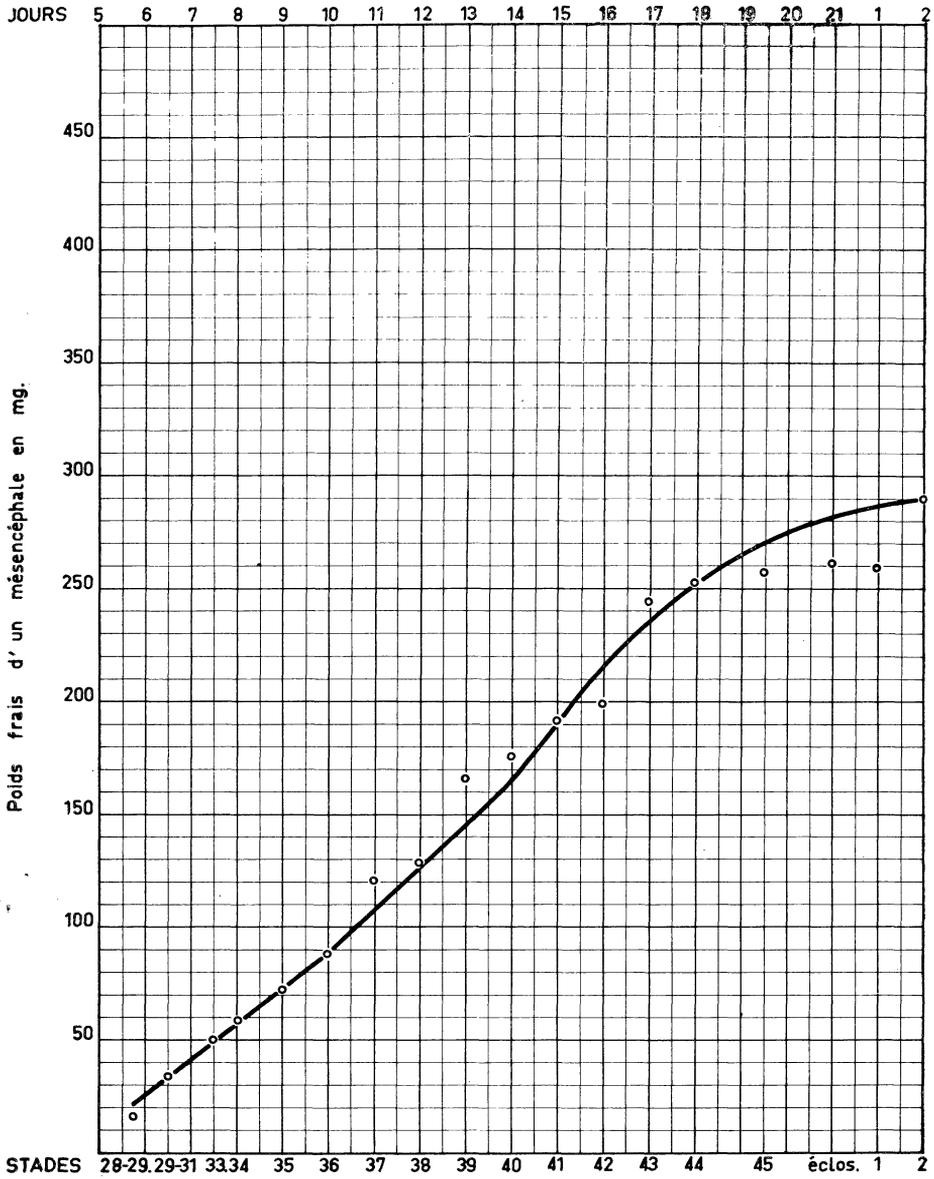
2. DISCUSSION.

Bien entendu, si l'on traite ces résultats en coordonnées semi-logarithmiques, on obtient la vitesse de l'augmentation en azote tissulaire, et l'on constate que cette vitesse diminue au cours du développement. C'est ainsi que GAYET (1955) avait déjà mis en évidence trois périodes dans l'évolution de l'azote total tissulaire du mésencéphale de l'embryon de Poulet. Une première phase, du *stade* 25 au *stade* 27, est caractérisée par une augmentation rapide de l'azote tissulaire ; une seconde phase, du *stade* 28 au *stade* 35, montre un certain ralentissement de l'augmentation ; une troisième phase, du *stade* 36 à l'éclosion, marque un ralentissement beaucoup plus important du processus.

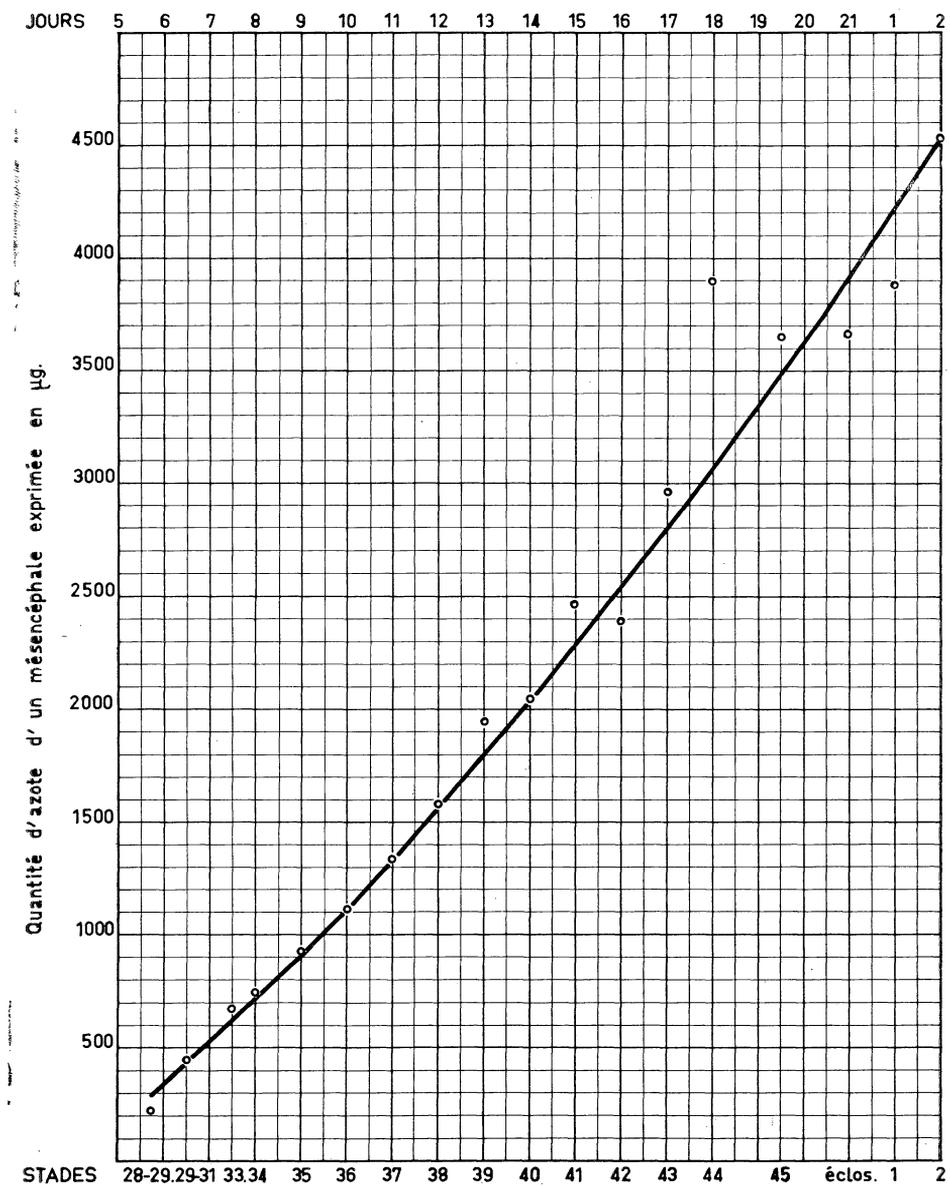
T A B L E A U 1

EVOLUTION DE L'AZOTE TOTAL ET DU POIDS FRAIS

Stades Jours	28-29 5 1/2-6	29-31 6-7	33 7-8	34 8	35 9	36 10	37 11	38 12	39 13	40 14	41 15	42 16	43 17	44 18	45 19-20	éclos 21	1j. 1	2j. 2
Quantité d'azote d'un mésencéphale exprimé en µg	218	447 +44	679 -	740 +37	928 +65	1110 +35	1330 +106	1580 +123	1939 +334	2039 +260	2462 +302	2383	2961 +136	3897	3627 +115	3660 +264	3869 +124	4520 4194
Poids frais d'un mésen- céphale (en mg)	16	34 +5	50 -	59 +9	72 +2	88 +2	121 +9	128 +11	166 +29	176 +22	192 +16	199	244 +6	252	257 +2	260 +8	258 +8	288
µg N/mg poids frais	14	13	14	13	13	13	11	12	12	12	13	12	12	15	14	14	15	16



GRAPHIQUE 1
Croissance, exprimée en mg de poids frais, des lobes optiques
de l'embryon de Poulet.



GRAPHIQUE 2

Evolution de la teneur en azote total des lobes optiques de l'embryon de Poulet.

En ce qui concerne les variations du rapport entre l'azote total et le poids frais du mésencéphale que nous avons notées dans les derniers stades, elles pourraient être significatives d'une augmentation ou d'une apparition de réserves azotées. Celles-ci peuvent être liées à la synthèse de protéines métaboliquement actives, et par là nous entendons protéines intervenant directement dans la fonction nerveuse — enzymes, acide glutamique, acide γ -aminobutyrique par exemple —.

Les mesures d'azote total ne permettent pas d'avoir de précisions sur le mode de croissance tissulaire. L'étude de l'évolution du phosphore de l'ADN complète ces résultats, en définissant les modalités de la croissance. Nous avons vu que la teneur en ADN pouvait être considérée comme le paramètre le plus stable d'une cellule. Le taux d'ADN, dans le cerveau comme dans tous les autres tissus, est proportionnel à la multiplication cellulaire (MANDEL et BIETH, 1952). GAYET (1955) évalue l'ADN du mésencéphale. D'après lui, l'accroissement du phosphore de l'ADN n'est pas une fonction linéaire du temps : du *stade* 26 (1,26 μg de P-ADN) au *stade* 30 (7,09 μg de P-ADN), le taux est multiplié par 4,4 en deux jours ; du *stade* 30 au *stade* 36 (10,26 μg de P-ADN), soit en trois jours, le taux n'est plus multiplié que par 1,4 ; enfin, du *stade* 36 à l'*éclosion* (13,07 μg de P-ADN), c'est-à-dire en 11 jours, le coefficient de synthèse de P-ADN n'est plus que de 1,3. O'CONNOR (1950) calcule que du 3^e au 8^e jour du développement chez le Poulet, le nombre des cellules en mitose passe de $8,0 \times 10^4$ par mm^3 à $0,04 \times 10^4$ par mm^3 .

D'après ces données, il apparaît que la multiplication cellulaire doit s'arrêter au 10^e jour, soit au *stade* 36, ce qu'il nous sera donné de vérifier par les méthodes morphologiques (voir partie V). La synthèse protoplasmique importante que GAYET observe du *stade* 25 au *stade* 35 correspond à cette phase de multiplication cellulaire en même temps qu'à la croissance des neuroblastes. A partir du *stade* 36, la multiplication cellulaire cessant, la synthèse protoplasmique n'interviendrait plus que dans la croissance (augmentation de taille des cellules, développement des prolongements cytoplasmiques et de l'axone) et les phénomènes de différenciation. BIETH et MANDEL (1950) constatent une importante synthèse de protéines ainsi qu'une lipogenèse active dans le cerveau de Poulet entre le 10^e jour du développement et l'*éclosion*. Nous verrons qu'à ce moment les mécanismes formateurs de protéines protoplasmiques, les nucléoles et les corps de Nissl, se développent.

Nous avons reporté, dans le tableau 2, les moyennes des mesures de diamètre des noyaux dans chaque strate. Nous constatons une brusque augmentation de la taille de ces noyaux dans les strates profondes 4 et 5 au *stade* 36 (10^e jour).

DIAMETRE DES NOYAUX AUX DIFFERENTS STADES DE L'EVOLUTION

	1	2 α	2 β	2 γ	2 δ	2a	3	4	5	6	7
26					9,6 ± 0,4						
27					9,6 ± 0,5						
28	9,8 ± 1,4				9,6 ± 0,3					9,1 ± 0,3	
29	10,2 ± 1,4						8,8 ± 0,1	14 ± 1		7,9 ± 0,1	
30-31	9,2 ± 1,3						8,6 ± 0,02	13,75 ± 1,7		8,3 ± 0,06	
32	10 ± 1,2						9,6 ± 1,25	13,8 ± 1,7		8,4 ± 0,06	
33	10,2 ± 1,3						10,8 ± 1,8	13,75 ± 1,2		9,6 ± 1,1	
34	9,8 ± 1,3						11,2 ± 2	12,5 ± 1,7	12,1 ± 1,1	10 ± 1	11,2 ± 0,1
35	9 ± 3,9		13,5 ± 1,2				12,8 ± 1,2	13 ± 1,4	12,25 ± 1,3	10 ± 3	12 ± 1,2
36	9,6 ± 1,4		13,75 ± 1,2				12,8 ± 1,2	12,8 ± 1,3	12,9 ± 2,4	12,4 ± 1,2	12 ± 1,4
37	9,7 ± 0,5	11,8 ± 1,6		10,6 ± 1,5			11,8 ± 0,3	15,8 ± 1,2	15,8 ± 1,3	12,5 ± 1,9	12 ± 0,1
38-39	10 ± 1,3	13,3 ± 1,2		12,9 ± 1,5			13,5 ± 1,7	15,8 ± 2,3	15,8 ± 1,7	13,75 ± 1,6	12 ± 1
40-41	10 ± 1,3	13,75 ± 1,9	12,3 ± 1,2	12,5 ± 1,5	13 ± 1,3		14,2 ± 1,6	15,8 ± 1,3	15,8 ± 2	13,4 ± 2	12,3 ± 0,2
42	10 ± 1	13,4 ± 2,05	12,9 ± 1,25	12,5 ± 2,02	12,2 ± 0,21	14 ± 0,26	14,2 ± 1,75	15,8 ± 1,2	15,8 ± 0,25	13,3 ± 0,2	11,4 ± 1,2
43	10,8 ± 1,6	14 ± 1,3	13,75 ± 1,6	13,5 ± 1,3	13,75 ± 2,8	14 ± 1,75	14,6 ± 2,25	15,8 ± 1	16 ± 1,5	14,16 ± 1,5	12,9 ± 1,7
44	10,8 ± 1	14,2 ± 2	14,6 ± 1,25	14,6 ± 0,3	13,4 ± 0,7	14,5 ± 1,3	14,5 ± 2,5	16 ± 2,2	17,5 ± 1,7	15 ± 0,2	12,1 ± 1,5
45	10 ± 0,25	14,7 ± 1,25	14,2 ± 2,6	14,6 ± 1,2	14,2 ± 1,8	14,4 ± 1,25	14,6 ± 2,1	16,5 ± 2,8	18,8 ± 2,5	15,2 ± 1,75	12,2 ± 2

V. - Les Acides nucléiques

1. — RÉSULTATS.

Au cours de la première phase du développement, les cellules sont petites, le cytoplasme en particulier est très réduit, le noyau fusiforme. Il est difficile de mettre en évidence de l'ARN dans ces cellules, seul le cytoplasme montre une légère réaction. L'ADN est localisé sur les chromocentres qui ont une réaction Feulgen-positive. Le terme chromocentre a ici un sens descriptif, et non un sens génétique ; ce sont des corpuscules de chromatine de forme plus ou moins arrondie, dispersés dans le caryoplasme ; les plus gros sont au centre du noyau, de plus petits granules de chromatine sont souvent accolés à la membrane nucléaire. Ces corpuscules présentent une réaction Feulgen-positive et se colorent intensément par les colorants basiques.

Au *stade* 25, l'aspect des cellules n'est pourtant pas le même dans toute l'épaisseur du tectum. Dans la zone paraventriculaire, la plupart des cellules sont en mitose, le protoplasme est clair, l'ADN apparaît au niveau des chromosomes. Dans la zone moyenne du manteau, les cellules sont indifférenciées et possèdent les caractères décrits plus haut. Les chromocentres sont nombreux et dispersés dans le caryoplasme. Mais à la périphérie, l'aspect est un peu différent : les noyaux des cellules sont légèrement plus volumineux, les chromocentres moins nombreux, mais plus gros. L'ARN cytoplasmique se concentre aux pôles du noyau. Ces cellules, en début de différenciation, correspondent aux cellules ayant une affinité pour l'argent ; ce sont des neuroblastes (Cf. Fig. 3, p. 30).

Jusqu'au *stade* 29, on note peu de changements, le nombre des neuroblastes augmente. Souvent on observe, dans ces cellules, que l'un des chromocentres, généralement situé au centre du noyau, est plus développé que les autres.

Au *stade* 29-30, un nucléole apparaît dans les noyaux des neuroblastes de la zone marginale. Le terme de nucléole désigne une zone

vacuolaire Feulgen-négative se formant dans un corpuscule de chromatine, généralement dans le chromocentre le plus développé (Fig. 10). Le matériel nucléolaire est constitué de protéines à caractère basique et d'ARN (HYDEN, 1943), de sorte qu'il a un caractère amphotère. A ce stade, il a une faible affinité pour les colorants basiques. L'ADN résiduel provenant du chromocentre entoure la masse nucléolaire et constitue la chromatine associée au nucléole, la « nucleolus associated chromatin » de CASPERSSON et THORELL (1941). CASPERSSON (1941) pense que le nucléole dériverait de l'hétérochromatine.

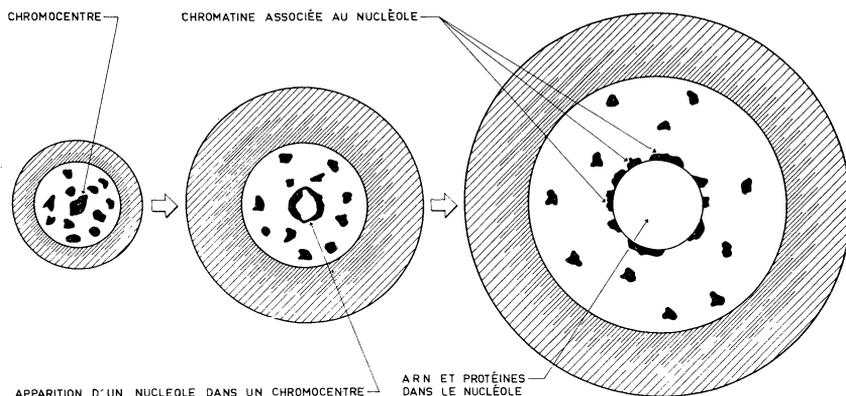


FIGURE 10

(d'après CASPERSSON, 1950)

Formation d'un nucléole à partir d'un chromocentre.

Le terme de nucléole n'est pas défini en cytologie. Pour certains auteurs, il représente l'ensemble constitué par la masse Feulgen-négative et la chromatine associée ; pour d'autres, il désigne seulement la zone vacuolaire, l'ADN étant exclu. Nous retenons la définition donnée par CASPERSSON (1950, p. 108) : « nucleoli are dense, rounded, as a rule optically homogeneous endonuclear bodies consisting of proteins in high concentration, rich in diaminoacids and associated with the cytoplasmic protein formation ».

Aux stades suivants (*stades* 30 à 33), les cellules ayant une affinité pour l'argent, cellules que nous avons définies comme étant des neuroblastes, localisées dans la couche neuroblastique externe (couche B) et la couche fibreuse profonde (couche C) possèdent toutes ce nucléole typique (Fig. 11). La masse nucléolaire grossit et sa basophilie augmente ; les colorations au bleu de toluidine et le test à la ribonucléase prouvent que la concentration en ARN a augmenté. L'anneau ADN positif provenant du chromocentre se fragmente en granules à la périphérie du nucléole. Le noyau de ces cellules est plus gros et devient

sphérique, on n'y observe plus les fins grains de chromatine dispersés dans le caryoplasme des stades précédents. L'ARN cytoplasmique augmente dans les neuroblastes, contre la membrane nucléaire.

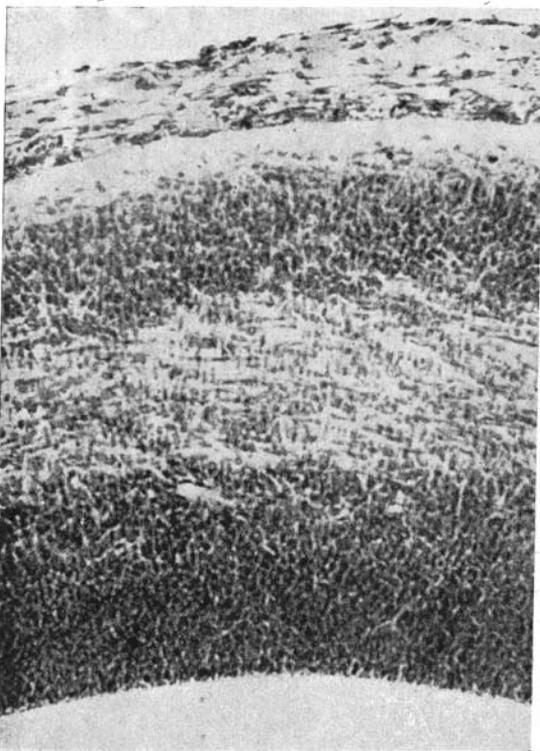


FIGURE 11

Lobe optique de l'embryon de Poulet. Stade 32 (7 jours). Coupe frontale au niveau du tectum. Bleu de toluidine. $\times 160$.

Les neuroblastes ayant migré hors de la couche germinative (couche D), on ne trouve plus que des cellules non différenciées dans sa région moyenne, et des cellules en mitose dans la région épendymaire. Dans sa zone périphérique, les cellules ont un peu évolué, leur noyau est plus sphérique, un gros chromocentre s'est différencié, mais il n'y a pas de nucléole.

Au *stade* 34, la stratification a progressé. Les cellules de la couche 2 sont indifférenciées, leur noyau est demeuré fusiforme, il est dépourvu de nucléole, mais le nombre des chromocentres a diminué, l'un étant souvent plus gros que les autres. Dans la couche 3, quelques cellules sont différenciées ; la plupart sont localisées dans la zone périphérique, mais quelques-unes sont dispersées dans l'épaisseur de la couche et représentent vraisemblablement des neuroblastes en migration.

C'est dans la couche 4, qui vient de se former, que l'on observe la différenciation la plus poussée. Les neuroblastes ont un gros noyau sphérique, le nucléole est bien développé, riche en ARN. L'ADN se concentre sur la « nucleolus associated chromatin ». La basophilie cytoplasmique a augmenté ; elle se présente sous forme de masses sphériques ou filamenteuses constituant les ébauches de corps de Nissl. Ces cellules se rencontrent aussi dans la couche sous-jacente (couche 5).

Le *stade* 35 et plus encore le *stade* 36 constituent des étapes importantes dans la différenciation de la cellule nerveuse. C'est dans la couche 4 que l'évolution est la plus caractéristique. Le noyau des cellules est très gros, le caryoplasme clair, la masse nucléolaire a

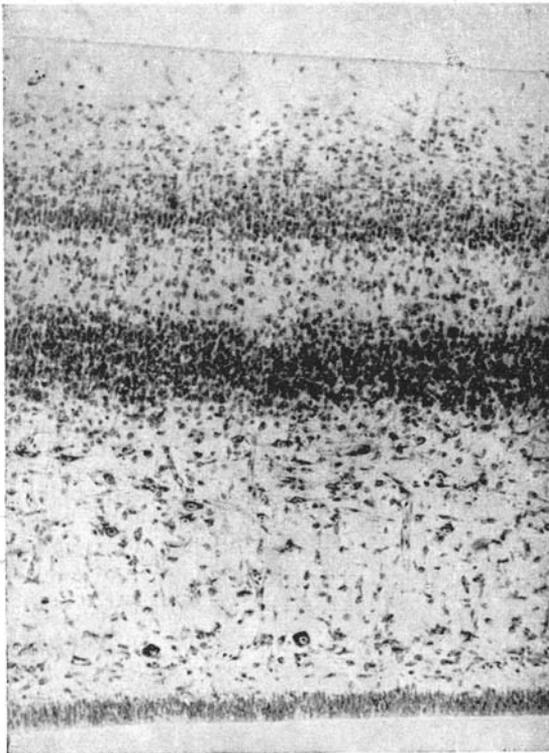


FIGURE 12

Lobe optique de l'embryon de Poulet. Stade 36 (10 jours). Coupe frontale au niveau du tectum. Bleu de toluidine. $\times 80$.

augmenté. Dans le cytoplasme, l'évolution se traduit par l'apparition des corps de Nissl typiques, constituant des concentrations importantes d'ARN. Dans cette couche, un certain nombre de cellules restent encore non différenciées. Dans les couches plus externes, la différenciation des neuroblastes s'est poursuivie, mais elle conserve un certain retard sur

la couche 4. Les neuroblastes des couches 2a et 3 ont un noyau plus petit, un nucléole moins développé, la basophilie cytoplasmique est encore faible. Seules les cellules de la zone moléculaire de la couche 3 sont un peu plus développées. Toute activité mitotique a cessé dans la couche germinative qui devient maintenant la couche épendymaire proprement dite (Fig. 12).

Dès que les corps de Nissl sont entièrement constitués, on peut considérer que les neuroblastes sont devenus des neurones (Fig. 13).

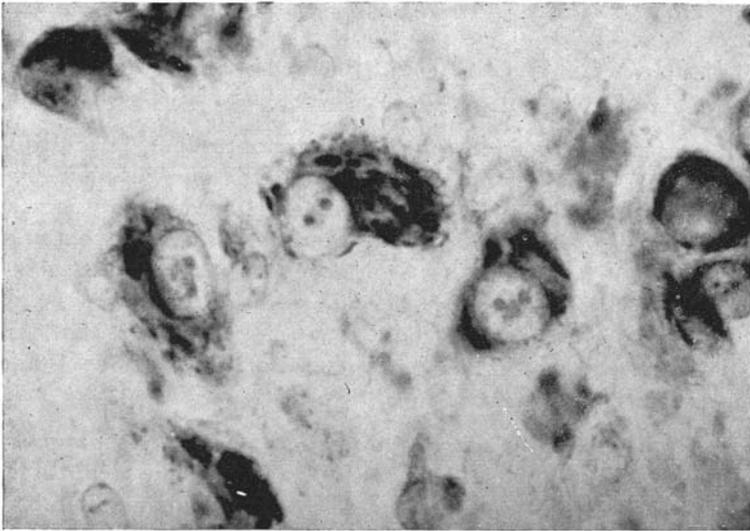


FIGURE 13

Lobe optique de l'embryon de Poulet. Neurones de la couche ganglionnaire (couche 4) du tectum. Stade 40 (14 jours). Bleu de toluidine. $\times 900$.

La différenciation se poursuit aux stades suivants. Au niveau cellulaire, elle correspond à une augmentation de la taille de la cellule, de son noyau et de son nucléole, à la localisation de l'ADN autour du nucléole sur la « nucleolus associated chromatin » qui est fragmentée en petites masses de chromatine, et à l'accroissement de l'ARN cytoplasmique au niveau des corps de Nissl plus nombreux. Sur le plan tissulaire, elle se traduit par l'évolution des neuroblastes des couches périphériques en neurones. Au *stade* 38, on observe des neurones typiques dans la zone moléculaire de la couche 3. La différenciation progresse en direction centripète. Au *stade* 40, les neuroblastes des couches 2 sont encore en voie de différenciation, dans la couche 3, le nombre de neurones a augmenté (Cf. Fig. 5).

Ce n'est qu'au *stade* 43 que les cellules des couches périphériques acquièrent réellement l'aspect de neurones, d'abord dans la couche 2a, puis dans la couche 2 γ ; et aux *stades* 44 et 45, dans les couches les plus externes 2 β et 2 α . Mais c'est dans la couche 4 que les neurones sont les plus volumineux ; ils ont une structure complexe caractérisée notamment par la richesse du cytoplasme en ARN, concentré sur les corps de Nissl. Leur nucléole est très développé et riche en ARN.

2. — DISCUSSION.

La différenciation de la cellule nerveuse, en ce qui concerne les acides nucléiques, se fait par étapes successives caractéristiques.

Au cours de la première phase du développement, la multiplication cellulaire est prédominante. Nous avons noté que jusqu'au *stade* 36, la couche germinative paraventriculaire a une activité mitotique, mais si entre le *stade* 25 et le *stade* 30, le nombre des cellules en mitose est élevé, à partir du *stade* 31, les figures de division cellulaire sont moins nombreuses et rares au *stade* 36. Les données fournies par GAYET (1955) concernant le développement du taux de phosphore de l'ADN au cours de la croissance du mésencéphale de l'embryon de Poulet sont en accord avec nos conclusions.

Une étude autohistoriographique récente d'ADN marqué par la thymidine - ^3H (SIDMAN et coll., 1959) a permis de définir de façon sûre les processus de la synthèse d'ADN dans la paroi du tube neural primitif. Cette synthèse aurait lieu durant l'intervalle mitotique, dans les cellules de la zone externe du manteau qui, comme le pensaient SAUER (1935) et HAMBURGER (1948) migrent en direction centripète pour se diviser dans l'épithélium épendymaire et retournent ensuite dans le manteau soit pour reprendre le processus de synthèse d'ADN, soit pour se différencier.

La migration centrifuge et la différenciation des cellules issues de la couche germinative ont été observées par HAMBURGER et LEVI-MONTALCINI (1950). Les premiers caractères de différenciation fournis par les acides nucléiques, bien qu'extrêmement discrets, apparaissent très tôt (*stade* 25). Le médulloblaste, cellule non différenciée, a un rapport nucléoplasmique élevé, et l'ARN semble concentré strictement dans le cytoplasme (compte tenu de la sensibilité des méthodes cytochimiques employées) ; l'ADN, élément caractéristique du génome, est dispersé sur de nombreux granules de chromatine. Dans les cellules présentant une affinité pour l'argent, les neuroblastes, l'ADN se concentre sur des chromocentres plus gros, moins nombreux ; en

même temps l'ARN cytoplasmique a tendance à s'amasser aux pôles du noyau. L'ARN cytoplasmique que l'on observe dans les premiers stades étudiés est en rapport avec la croissance cellulaire, c'est-à-dire l'augmentation de la masse cytoplasmique. Mais il serait aussi en rapport avec la différenciation du neuroblaste à partir de la cellule indifférenciée du tube neural, l'ARN intervenant certainement dans la synthèse ou la différenciation du matériel neurofibrillaire.

Un nucléole typique se forme au *stade* 29-30 dans des chromocentres ADN positif. Le test à la ribonucléase permet d'affirmer la présence d'ARN dans ce nucléole, mais à une concentration relativement faible. L'ADN résiduel forme à son contact une sorte d'anneau incomplet, la chromatine associée au nucléole. LA VELLE (1951-1956) a décrit le développement de ce nucléole dans le cortex de l'embryon de Cobaye. Simultanément, la basophilie cytoplasmique observée précédemment augmente aux pôles du noyau.

L'apparition d'ARN dans un nucléole et sa localisation cytoplasmique au contact du noyau schématise la régulation des fonctions somatiques de la cellule nerveuse par le noyau. Elle illustre l'induction des processus de synthèse par l'ADN et l'ARN. Les acides nucléiques interviennent dans la transmission des caractères héréditaires du noyau au cytoplasme. De nombreuses théories ont été émises. Les gènes, supports des caractères héréditaires, sont constitués d'ADN sous forme de longues chaînes de polynucléotides. Ceux-ci induiraient la synthèse de ribonucléotides et de protéines riches en acides diamminés dans le nucléole. Ces protéines passent dans le caryoplasme, traversent la membrane nucléaire et induisent la synthèse d'ARN cytoplasmique, celui-ci permettant l'élaboration de protéines (CASPERSSON, 1950). Pour EINARSON (1957), l'ADN induit la synthèse d'ARN nucléolaire, qui passe directement dans le cytoplasme où il induit la synthèse de protéines. AMANO et LEBLOND (1960) étudient la vitesse d'incorporation de précurseurs de l'ARN tels que la cytidine-³H ou l'uridine-³H dans la chromatine, le nucléole et le cytoplasme du foie, du pancréas et d'autres tissus de souris ; ils constatent que la synthèse d'ARN dans la chromatine et le nucléole est rapide, elle est suivie, plus tard, par la synthèse d'ARN cytoplasmique. Ce retard correspondrait au passage de l'ARN du nucléole au cytoplasme. MERRIAM et KOCH (1960) étudient la perméabilité de la membrane nucléaire envers de grosses molécules telles que celles d'ARN. L'existence de « pores » au niveau de la double membrane nucléaire, révélée au microscope électronique, pourrait expliquer le passage des molécules d'ARN qui se fixent ensuite sur le réticulum endoplasmique, lui-même en continuité avec l'espace périnucléaire (WATSON, 1954). Une autre possibilité consisterait en une synthèse de médiateurs spécifiques par l'enveloppe nucléaire elle-même sous

l'influence d'agents tant cytoplasmiques que nucléaires et qui ne peuvent traverser cette enveloppe (WATSON, 1955). Peut-être la phosphatase alcaline que l'on décèle sur la membrane nucléaire interviendrait-elle dans ce processus. Mais s'il y a passage d'une induction des synthèses protéiques du nucléole au cytoplasme, que se passe-t-il lorsque le nucléole n'est pas différencié et que déjà on observe une légère basophilie due à l'ARN dans le cytoplasme ? Les méthodes histochimiques employées ne sont pas assez sensibles pour mettre en évidence la présence hypothétique d'une faible quantité d'ARN. On peut cependant admettre que celle-ci est présente dans la chromatine et forme une sorte de nucléole virtuel.

L'apparition d'un nucléole typique au *stade* 29, dans les cellules périphériques des lobes optiques, confirme la différenciation neuroblastique. Primitivement assez pauvre en ARN, le nucléole s'enrichit progressivement en cet acide, en même temps que son volume augmente. Le tableau 2, concernant des mesures de diamètres nucléaires, montre que l'apparition de ce nucléole dans la cellule coïncide avec une brusque augmentation de taille du noyau. Parallèlement, la basophilie cytoplasmique s'accroît. La taille du nucléole est donc bien en rapport avec le processus des synthèses protéiques. Dans des cellules qui ne forment pas ou peu de protéines cytoplasmiques, le nucléole est absent (CASPERSSON, 1950). Dans des cellules en mitose, chez qui par conséquent la croissance est interrompue, le nucléole disparaît.

Cette première phase, correspondant à la formation d'un nucléole au *stade* 29, est suivie par une seconde phase plus importante qui se situe au *stade* 35-36 ; elle est caractérisée par l'individualisation des corps de Nissl dans le cytoplasme ; jusqu'alors, on avait noté une basophilie diffuse. Cette seconde phase est accompagnée par un second accroissement brusque de taille des noyaux. Ce phénomène s'observe très bien dans les neurones de la couche ganglionnaire (couche 4) qui est la plus précoce (la taille des noyaux passe de 12,8 μ à 15,8 μ du *stade* 35 au *stade* 36).

L'apparition des corps de Nissl dans la cellule est le critère qui permet de définir la différenciation du neuroblaste en neurone fonctionnel. Ce critère n'est pas défini par un choix empirique mais peut trouver une explication rationnelle : en effet, la spécialisation qui est le terme de la différenciation cellulaire s'effectue grâce à la synthèse de constituants cellulaires nouveaux, protéines spécifiques, enzymes, et par l'intermédiaire de l'ARN.

Nous avons déjà abordé, dans l'introduction, le problème de l'existence vraie des corps de Nissl ; l'observation au microscope électronique montre que ces structures correspondent à l'association du réticulum

endoplasmique et des grains de Palade (PALAY, 1956). Les biochimistes isolent ce complexe sous forme de particules, les microsomes, contenant la presque totalité de l'ARN, et montrent que l'incorporation d'acides aminés marqués par cette fraction est très élevée (BORSOOK et coll., 1950). C'est bien au niveau des corps de Nissl que se fait donc la synthèse des protéines, enzymes et substrats. HYDEN (1955) a montré que les corps de Nissl étaient liés à la fonction nerveuse : au cours d'une activité intense, le taux de protéines d'une cellule nerveuse peut être réduit au tiers de sa valeur, ce qui signifie que la majeure partie des protéines est détruite et doit être régénérée par le processus décrit précédemment.

VI. - La Phosphatase Alcaline

1. — RÉSULTATS.

Au *stade* 24, la couche cellulaire unique constituant la paroi des lobes optiques montre une réaction enzymatique notable (Fig. 14). Seuls les noyaux des cellules sont positifs : le caryoplasme est riche

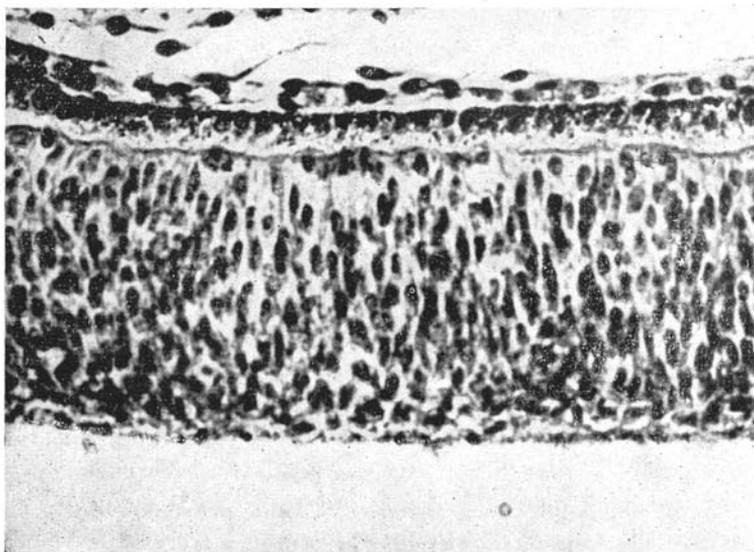


FIGURE 14

Activité de la phosphatase alcaline au niveau des lobes optiques de l'embryon de Poulet. Stade 25 (4 jours $\frac{1}{2}$). Coupe frontale. Technique de Gomori. Incubation : 3 heures. \times 150.

en phosphatase, il apparaît uniformément gris, les chromocentres dispersés et nombreux ont une activité intense, ils apparaissent très noirs. Ils ont le même aspect dans toute l'épaisseur de la couche. Aucune

activité cytoplasmique n'est décelable. Dans la couche germinative, les cellules en mitose montrent une activité phosphatasique localisée au niveau des chromosomes.

Dans le tegmentum, à la périphérie de la zone cellulaire, la mince couche fibreuse qui s'interrompt au niveau des parois latérales a une réaction enzymatique positive.

A partir du *stade* 26-28, il s'établit un gradient d'activité de la phosphatase dans la paroi des lobes. Dans le tegmentum, l'activité est demeurée sensiblement constante, elle a diminué dans les parois latérales et le tectum. La couche fibreuse externe, précédemment localisée au tegmentum, s'est étendue aux parois latérales et au tectum, de sorte qu'elle enveloppe totalement les lobes optiques. Son activité enzymatique, soumise au gradient ventro-dorsal, est partout plus élevée que dans la couche cellulaire voisine ; l'enzyme est localisée au niveau de ces amas fibreux. La couche cellulaire n'a plus le même aspect dans toute son épaisseur. La partie profonde, couche des cellules en mitose et couches cellulaires voisines, a une activité très réduite. Par contre, les cellules les plus périphériques de la couche ont une activité phosphatasique plus élevée, localisée toujours dans les noyaux et plus particulièrement dans les chromocentres, avec une très légère réaction du caryoplasme. De l'extérieur des lobes vers les ventricules, on observe donc :

- une couche de fibres où l'activité de la phosphatase est élevée ;
- une zone de cellules où les noyaux possèdent une activité limitée aux chromocentres ;
- une zone de cellules à faible activité enzymatique.

Au *stade* 29, le développement des lobes optiques, caractérisé par l'épaississement de la couche fibreuse et de la couche germinative et la migration de cellules vers la périphérie, possède une activité de la phosphatase légèrement augmentée dans le tectum, de sorte que le gradient ventro-dorsal s'atténue.

Aux *stades* 30 à 33, une partie des cellules provenant de la couche germinative D, à faible activité phosphatasique, a traversé le faisceau de fibres tecto-bulbaire C, et a constitué la couche cellulaire épaisse B. Cette strate a une faible activité enzymatique, plus grande toutefois que la couche D. (Fig. 15). L'enzyme n'est décelable que dans les noyaux, au niveau des chromocentres. Ces cellules sont très peu différenciées. Extérieurement, la couche B est bordée par la mince bande de fibres optiques de la couche A qui a une activité comparable à celle des fibres de la couche C. Les couches A et C ne sont pourtant pas semblables. La strate A est uniquement constituée de fibres alors que dans la couche C, outre les fibres riches en phosphatase, on observe de

nombreuses cellules ; les unes non différenciées ont un noyau petit et positif, d'autres sont à un stade de différenciation avancé ; elles ne possèdent toujours pas de phosphatase dans le cytoplasme, mais leur noyau, plus gros et à caryoplasme clair, a un nucléole très riche en enzyme.

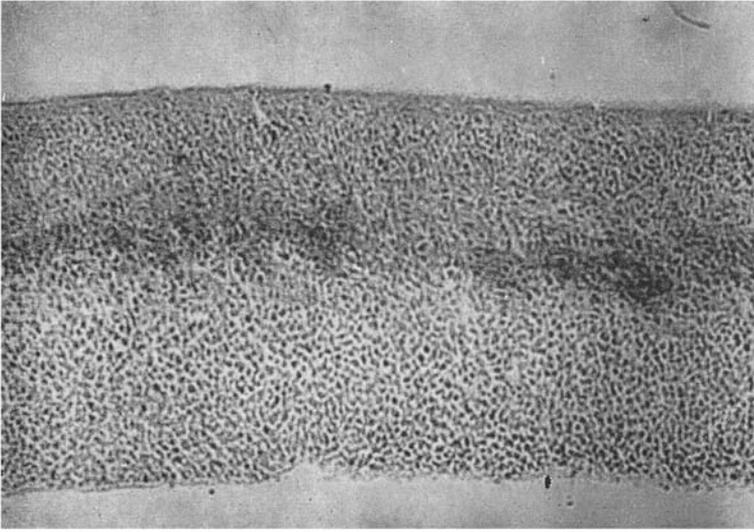


FIGURE 15

Activité de la phosphatase alcaline au niveau des lobes optiques de l'embryon de Poulet. Stade 30/31 (6-6 jours $\frac{1}{2}$). Coupe frontale. Technique de Gomori. Incubation : 2 heures. $\times 130$.

Au *stade 34*, des changements importants se sont produits, qui concernent la localisation de la phosphatase (Fig. 16). D'une part, alors qu'aux stades précédents, l'activité maximum s'observait dans les couches externes, il se produit un déplacement de la réaction dans l'épaisseur des lobes, l'intensité maximum se localise dans les strates profondes : la couche germinative et les trois strates 4, 5 et 6 issues de la couche C. D'autre part, il apparaît une activité enzymatique dans le cytoplasme au niveau de certaines couches. Cette activité est nette dans la couche des fibres du nerf optique (couche 1), et elle existe, tout en étant plus faible, dans la couche 2, l'une des strates issues de la couche B. Les cellules de la couche 4 sont bien différenciées, la phosphatase prédomine dans le nucléole, le caryoplasme est légèrement positif, beaucoup moins que dans les cellules indifférenciées. Comme dans la couche 2, on décèle une légère activité enzymatique du cyto-

plasme. La couche des fibres tectobulbaires (couche 5) est toujours riche en phosphatase. Celle-ci se localise sur les fibres, mais également sur les noyaux des cellules en migration. Dans la couche voisine 6, les cellules sont petites et seul leur noyau donne une réaction intense. Dans la couche germinative 7, les cellules ont le même aspect qu'aux stades précédents, mais l'activité a augmenté. Dans les strates externes, la réaction est assez faible ; dans les couches cellulaires 2a et 3, elle

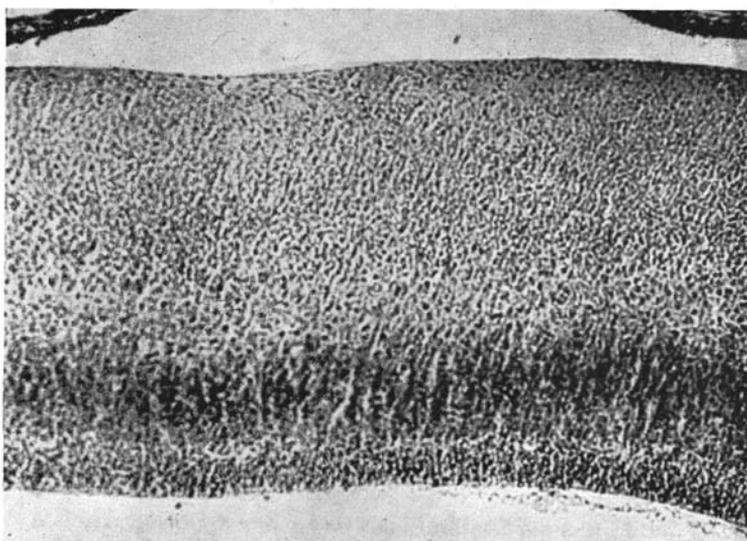


FIGURE 16

Activité de la phosphatase alcaline au niveau des lobes optiques de l'embryon de Poulet. Stade 34 (8 jours). Coupe frontale. Technique de Gomori. Incubation : 2 heures. $\times 120$.

est localisée aux noyaux. Pourtant, nous devons signaler l'activité plus intense des neuroblastes de la zone moléculaire (partie externe de la couche 3).

Au *stade 36*, l'activité de la phosphatase s'est accrue dans les couches plexiformes et on peut confirmer la localisation cytoplasmique de l'enzyme amorcée au stade précédent (Fig. 17). Dans les couches profondes 4, 5 et 6, où le nombre des cellules différenciées est plus grand, l'hydrolyse enzymatique est élevée. Les cellules ont un noyau clair mais à nombreux granules riches en phosphatase, un nucléole et une membrane nucléaire intensément actifs. Elles correspondent aux neurones ayant déjà acquis une basophilie cytoplasmique. L'activité

enzymatique est élevée dans la couche épendymaire qui a perdu son activité mitotique ; elle est très élevée au niveau des vaisseaux sanguins, localisés pour la plupart dans les couches profondes.



FIGURE 17

Activité de la phosphatase alcaline au niveau des lobes optiques de l'embryon de Poulet, Stade 36 (10 jours). Coupe frontale. Technique de Gomori. Incubation : 1 h. 30. $\times 80$.

Aux stades suivants, la phosphatase augmente dans les couches plexiformes et les fibres nerveuses.

Au stade 40, la couche des fibres du nerf optique a conservé la très forte activité des premiers stades, elle enveloppe le mésencéphale d'un liseré très sombre (Fig. 18). Les terminaisons nerveuses des fibres qui s'enfoncent perpendiculairement dans l'épaisseur du mésencéphale et entrent en contact avec les dendrites de neurones mésencéphaliques forment des couches plexiformes à forte activité phosphatasique (couches 2 α , 2 β , zone externe de la couche 3) qui alternent avec des couches cellulaires, pauvres en phosphatase (2a - 3). Le nombre de cellules indifférenciées ou peu différenciées est encore élevé.

C'est dans la couche ganglionnaire 4 que les neurones sont le plus différenciés, les noyaux ont l'aspect décrit aux stades précédents, les

plexus péricellulaires sont riches en phosphatase. Les couches profondes 5, 6 et 7 ont l'activité phosphatasique la plus élevée, les fibres et les noyaux sont intensément colorés. Les parois vasculaires sont également riches en enzyme dans toute l'épaisseur des lobes optiques.



FIGURE 18

Activité de la phosphatase alcaline au niveau des lobes optiques de l'embryon de Poulet, Stade 40 (14 jours). Coupe frontale. Technique de Gomori. Incubation : 1 heure. $\times 80$.

A partir du *stade* 41, le changement dans la localisation de la phosphatase alcaline qui s'amorçait aux stades précédents s'accroît (Fig. 19) : l'activité de la phosphatase augmente rapidement dans le neuropile, alors qu'elle est faible dans les noyaux. Ce changement s'observe d'abord dans les couches profondes, en particulier dans la couche ganglionnaire ; les plexus péricellulaires, dans lesquels les noyaux forment des taches claires où seul le nucléole a une grande activité, sont fortement positifs.

Ainsi, les couches plexiformes donnent une réaction intense tandis que les couches cellulaires sont plus claires. La couche 4 a un aspect spongieux dû à ce que ni le noyau ni le péricaryon ne possèdent d'activité enzymatique.

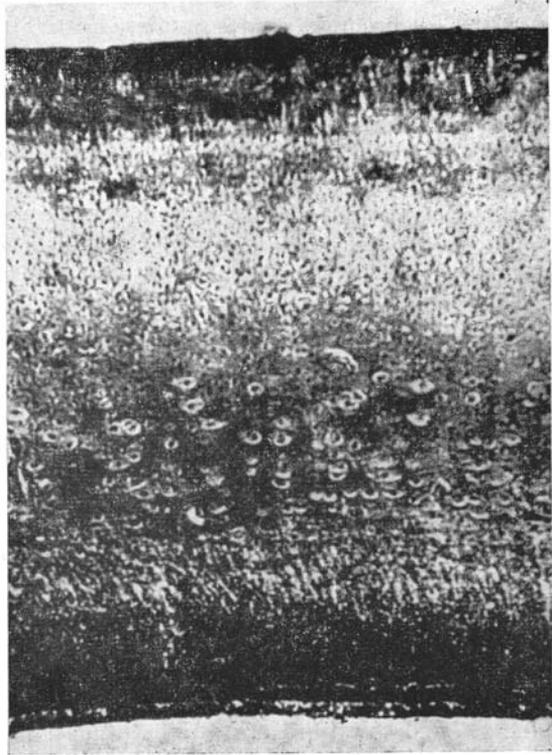


FIGURE 19

Activité de la phosphatase alcaline au niveau des lobes optiques de l'embryon de Poulet, Stade 45 (20 jours). Coupe frontale. Technique de Gomori. Incubation : 0 h. 45. $\times 80$.

2. — DISCUSSION.

De cette étude, il ressort que, d'une part, l'activité de la phosphatase alcaline des lobes optiques augmente au cours du développement, que, d'autre part, le lieu d'activité enzymatique varie : l'enzyme décelable dans les noyaux cellulaires au cours des premiers stades, se localise par la suite dans le cytoplasme et le neuropile.

En ce qui concerne l'activité de l'enzyme, l'estimation que nous en avons faite ne peut être que subjective. ROGERS et coll. (1960) ont évalué biochimiquement l'activité de la phosphomonoestérase alcaline des lobes optiques de l'embryon de Poulet ; nos conclusions sont en accord avec leurs résultats. Ils expriment l'activité enzymatique en molécules-grammes de substrat hydrolysées par milligrammes d'azote tissulaire et par heure. Leur étude débute au 6^e jour du développement. A ce stade, $2,25 \times 10^{-6}$ mol. de substrat sont hydrolysées. L'activité croît assez rapidement jusqu'au 10^e jour, où la valeur obtenue est de $5,5 \times 10^{-6}$ mol. ; elle augmente beaucoup plus vite du 10^e au 16^e jour, où elle atteint un maximum de $2,25 \times 10^{-5}$ mol.

Dans les premiers stades étudiés, l'activité phosphatasique se décèle dans les noyaux et la couche fibreuse externe : l'enzyme est présente dans le caryoplasme, mais son activité est faible ; par contre, l'activité est élevée au niveau des chromocentres et de la membrane nucléaire. Lorsque le nucléole se différencie, il a une très forte activité. L'activité élevée de la phosphatase alcaline que l'on décèle dans la couche fibreuse est en rapport avec une phase de croissance et de différenciation de ces fibres (ce que montre l'étude de la neurofibrillogenèse). Cette hypothèse trouve en effet une vérification dans le fait que c'est au niveau du tegmentum où la croissance est plus importante et la différenciation plus précoce que dans le tectum, que l'activité enzymatique est la plus élevée. L'activité phosphatasique nucléaire est sans doute en relation avec l'activité mitotique des cellules. Si l'on admet l'hypothèse de SAUER (1935) et de SIDMAN et coll. (1959), selon laquelle les cellules de la couche D sont pour la plupart des cellules germinatives en phase intermitotique, phase de synthèse d'ADN par conséquent, on peut conclure que la phosphatase alcaline doit jouer un rôle dans la multiplication cellulaire. D'après CHÉVREMONT et coll. (1953), la phosphatase alcaline est nécessaire à la synthèse de l'ADN : lors de la mitose, le beryllium, inhibiteur spécifique des phosphatases, détermine un arrêt des mitoses à la métaphase.

Mais la présence d'une activité enzymatique nucléaire dans des couches où les cellules ne se divisent pas, ne peut relever de la même interprétation. Rappelons que l'activité enzymatique de la couche B aux stades 30 à 33 est plus élevée que celle de la couche D. Dans cette couche B, la phosphatase alcaline pourrait avoir un rôle à jouer dans la prédifférenciation de la cellule, en relation en particulier avec l'augmentation de la basophilie cytoplasmique. On constate en effet, dans ces cellules, que le nucléole est riche en phosphatase. MOOC (1944, 1946) étudiant le développement de l'activité phosphomonoestérasique alcaline dans le tissu embryonnaire du Poulet a émis, pour la première fois, cette hypothèse. Cet auteur constatait une augmentation de l'activité enzymatique dans la première phase du développement, lors de la différenciation de la cellule du tube neural en neuroblaste. Ses observations s'interrompent au 7^e jour d'incubation. Une augmentation similaire de l'activité de la phosphatase alcaline est observée par CHIQUOINE (1954) dans le système nerveux central de l'embryon de Souris, du 6^e au 14^e jour du développement.

La différenciation morphologique s'achève relativement tôt. La plupart des travaux d'ordre tant histochimique que biochimique n'ont pas envisagé la période correspondant à l'apparition d'une activité fonctionnelle. Ce n'est réellement qu'à partir du stade 34 qu'une activité enzymatique cytoplasmique peut être observée. Cette apparition coïncide

avec le développement de la basophilie cytoplasmique précédant l'apparition des corps de Nissl. L'activité enzymatique cytoplasmique s'accroît aux stades suivants ; à partir du stade 38, elle gagne les couches plexiformes et le neuropile ; dans le noyau, l'activité enzymatique se limite au nucléole. La persistance et l'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline après la différenciation suggèrent un rôle possible de l'enzyme dans des processus métaboliques autres que ceux définis précédemment. La forte activité enzymatique du neuropile dans les stades très différenciés accrédite l'hypothèse d'un rôle possible de la phosphomonoestérase alcaline dans l'activité nerveuse, peut-être en intervenant dans la perméabilité de la membrane. En effet, les travaux de PETERS et coll. (1956) ont permis de mettre en évidence les premiers signes d'une activité bioélectrique dans les lobes optiques du Poulet dès le 10^e jour du développement embryonnaire.

La localisation nucléaire de l'enzyme a fait l'objet de nombreuses discussions (BRACHET et JEENER, 1946-1948 ; GOMORI, 1951). La plupart des auteurs pensent qu'il s'agit là d'un phénomène de contamination. CHÉVREMENT et FIRQUET (1953) avaient toujours obtenu, quel que soit le substrat utilisé, une activité enzymatique des noyaux. La mise au point par un élève de CHÉVREMENT d'une technique d'inclusion différente rend la présence de la phosphatase dans le noyau plus douteuse (MICHEL et coll., 1958). KRUGELIS (1946) étudie la distribution et les propriétés intracellulaires des phosphatases alcalines et en définit trois types, deux d'entre eux correspondant à des phosphodiéstérases, le troisième a une phosphomonoestérase. D'après cet auteur, le complexe phosphatasique nucléaire et le complexe phosphatasique cytoplasmique consisteraient chacun en une phosphodiéstérase spécifique, qui estérifierait la chaîne entre le phosphate d'un nucléotide et le sucre du nucléotide voisin, et une phosphomonoestérase qui libérerait un phosphate inorganique. Il est vraisemblable que les phosphatases, comme nous l'avons vu dans l'introduction, interviennent dans le métabolisme des acides nucléiques. Dans les glandes salivaires des larves de *Drosophile*, l'activité enzymatique se localise sur les zones du chromosome qui sont Feulgen-positives (KRUGELIS). D'autre part, le taux de renouvellement du phosphore de l'ADN mesuré à l'aide de P-radioactif montre une relation satisfaisante avec l'intensité de la réaction de Gomori (BRACHET et JEENER, 1948). BRACHET (1952) suggère l'existence d'un contrôle nucléaire du couplage entre oxydation et phosphorylation.

On doit reconnaître que l'activité phosphatasique alcaline des noyaux des cellules adultes, sauf quelques rares exceptions, dont les neurones, semble résulter d'une diffusion. Chez l'embryon, les résultats se présentent différemment : dans les premiers stades étudiés, les cellules possèdent peu de cytoplasme et celui-ci ne présente pas d'activité

phosphatasique décelable ; il y a donc peu de chances pour que l'enzyme soit déplacée en totalité. RICHTER (1955) écrit que « the alkaline phosphatase, which is believed to be concerned in nucleoprotein metabolism, is present in isolated nuclei from cells of the cerebral cortex : it is several times more active in nuclei taken from young than from old brains ».

Jusqu'à présent, on n'a pu qu'émettre des hypothèses quant au rôle, ainsi qu'au mode d'action des phosphatases dans la cellule. Le transfert de phosphates par la phosphatase alcaline est un processus connu. MEYERHOF et GREEN (1950) étudient l'action de la phosphatase alcaline intestinale et démontrent que la synthèse d'esters-phosphate en présence de phosphatase alcaline est due à des phénomènes de transphosphorylation ; le phosphate ne passe pas à l'état d'ion inorganique. Le transfert se fait à partir d'un phosphate de niveau énergétique élevé sur un ester de niveau énergétique plus bas. Bien que n'ayant étudié que la phosphatase alcaline de l'intestin, ces auteurs pensent que le processus est général.

En fait, ainsi que l'écrivent COHN et RICHTER (1956), « the significance of the presence of the phosphomonoesterase in nervous tissue is still unknown ».

VII. - La Succinodeshydrogenase

1. — RÉSULTATS HISTOCHIMIQUES.

Le mésencéphale embryonnaire du Poulet non fixé se prête assez mal à la confection de coupes à congélation : la paroi des lobes est très mince et limite une large cavité ventriculaire dans les stades précoces, ce qui augmente la difficulté. Les observations que nous avons pu faire concernant l'activité de la succinodéshydrogénase (SDH) au cours des *stades* 26 à 32 sont partielles et incomplètes.

Au *stade* 29, l'unique couche des lobes optiques montre une activité enzymatique extrêmement faible, localisée aux cellules les plus périphériques, qui sont les plus différenciées.

A partir du *stade* 33, l'étude de l'activité de la SDH est rendue plus aisée par l'épaississement des parois. Les deux couches cellulaires — la couche neuroblastique externe et la couche germinative — ont une très légère réaction, l'activité dans ces deux couches se localisant dans les cellules externes plus différenciées. L'activité enzymatique se manifeste sous forme de fins granules de formazan dispersés dans le cytoplasme.

La couche fibreuse externe A, n'a aucune activité SDH. Les fibres du faisceau tecto-bulbaire (couche C) sont également négatives ; seules dans cette couche les cellules migrant de la couche germinative vers la couche neuroblastique externe montrent une légère activité.

Aux *stades suivants*, l'activité enzymatique du tectum est toujours très faible, beaucoup plus faible que celle que l'on décèle dans les cellules des noyaux moteurs du tegmentum. Le développement de l'activité SDH est lié à la différenciation des cellules : c'est dans le corps cellulaire des neurones bien différenciés de la couche ganglionnaire (couche 4) que l'activité est la plus élevée. L'enzyme n'apparaît que dans les corps cellulaires ; les couches fibreuses ne sont pas positives.

La couche 1, des fibres du nerf optique, est négative, les couches 2 ($\alpha\beta\gamma$) qui ne sont pas encore individualisées ont une activité succinodéshydrogénase moyenne, 2a et 3 une plus forte activité. Dans la couche 3, l'enzyme se concentre dans la zone périphérique, pourtant moins riche en cellules, mais celles-ci sont plus différenciées et il semble en outre qu'il apparaisse une légère réaction enzymatique du neuropile. Les neurones de la couche ganglionnaire montrent de fins granules de formazan qui se dispersent dans le cytoplasme du corps cellulaire et des prolongements protoplasmiques. La couche 5 est inchangée par rapport aux stades précédents. Dans la couche 6, l'activité SDH se décèle non seulement dans les neurones, mais aussi dans la paroi des vaisseaux sanguins nombreux dans cette région. Les cellules de la couche 7 ont une faible activité, plus faible, semble-t-il, qu'aux stades précédents.

A partir du *stade* 38 débute une seconde phase dans l'activité de la succinodéshydrogénase, qui intéresse non seulement les corps cellulaires, mais le neuropile. En effet, les couches plexiformes ont une réaction positive. Il semble que l'enzyme gagne secondairement les prolongements cytoplasmiques du neurone. Ce n'est pas encore une réaction très prononcée.

La couche 1 demeure négative. Les strates issues de la couche 2 ont une légère réaction due à la localisation de l'enzyme dans le neuropile et les corps cellulaires : 2 ($\alpha\beta$) a une activité enzymatique moyenne, 2 ($\gamma\delta$) une activité plus élevée due au nombre plus grand des cellules. 2a a une forte activité. Les neuroblastes de la couche 3 sont riches en SDH dans sa partie périphérique, pauvres dans sa partie profonde. Dans la couche 4, on note une prédominance de l'activité des péricaryons sur celle du neuropile, assez faible. La couche 5 très faiblement positive est traversée par des vaisseaux sanguins provenant de la couche 6 et qui possèdent une assez forte activité SDH. La couche 6, elle-même, a sensiblement l'activité de la couche ganglionnaire : outre les nombreux vaisseaux, on y trouve les cellules du noyau mésencéphalique du trijumeau à activité nettement plus élevée que celle que nous avons décelée dans les couches précédentes. Enfin la couche 7 n'est que faiblement positive.

A partir du *stade* 40 (Fig. 20), l'augmentation de la SDH est nette. Elle croît dans les corps cellulaires déjà bien différenciés de la couche 4 et elle apparaît dans des cellules peu différenciées encore des couches externes ; simultanément, elle augmente ou apparaît dans le neuropile des couches externes. Les fibres mêmes du nerf optique sont définitivement négatives, mais leurs terminaisons dans les couches plus profondes sont positives. L'enzyme se concentre dans les neurones d'association

FIGURE 20

Activité SDH au niveau
des lobes optiques de
l'embryon de Poulet.
Stade 40 (14 jours).
Coupe frontale. NNT :
1 h. 30. $\times 150$.

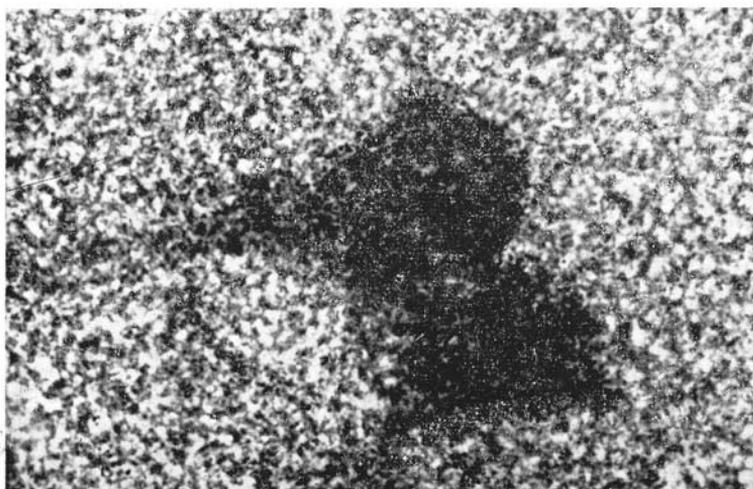


FIGURE 21

Activité SDH des neurones de la couche ganglionnaire (couche 4)
des lobes optiques de l'embryon de Poulet. Stade 43
(17 jours) NNT : 2 heures. $\times 1.800$.

des couches 2 α et 2 γ , et au niveau des synapses qui se sont établies dans ces couches. Par contre, la couche synaptique 2 δ est négative, la couche 2 β a une réaction faible. Deux couches cellulaires voisines, 2 α et 3, ont des réactions différentes : une forte concentration enzymatique dans le corps cellulaire des neurones de la couche 2 α , une activité faible dans la couche 3 sauf dans sa partie périphérique où corps cellulaires et neuropile sont intensément positifs. Les couches 4, 5 et 6 n'ont pas changé ; les neurones de la couche 4, très développés, montrent une répartition de l'enzyme dans la totalité du cytoplasme des corps cellulaires, des dendrites et de l'axone, avec une concentration un peu plus forte contre la membrane nucléaire (Fig. 21). Le neuropile de cette couche a peu d'enzyme.

La couche 7 semble avoir perdu toute activité.

A l'écllosion, la stratification, dans les couches externes, s'est effacée, l'activité dans les couches plexiformes et dans les couches cellulaires étant sensiblement égale, sauf dans la couche 2 δ qui demeure négative. La strate neuroblastique externe 3 n'a pas acquis une activité plus importante ; les couches profondes sont inchangées.

2. — RÉSULTATS BIOCHIMIQUES.

Activité du système de la succinoxydase.

Les résultats sont exposés dans le tableau 3 et schématisés dans les graphiques 3 et 4. Chaque chiffre correspond à la moyenne effectuée sur 15 mesures environ.

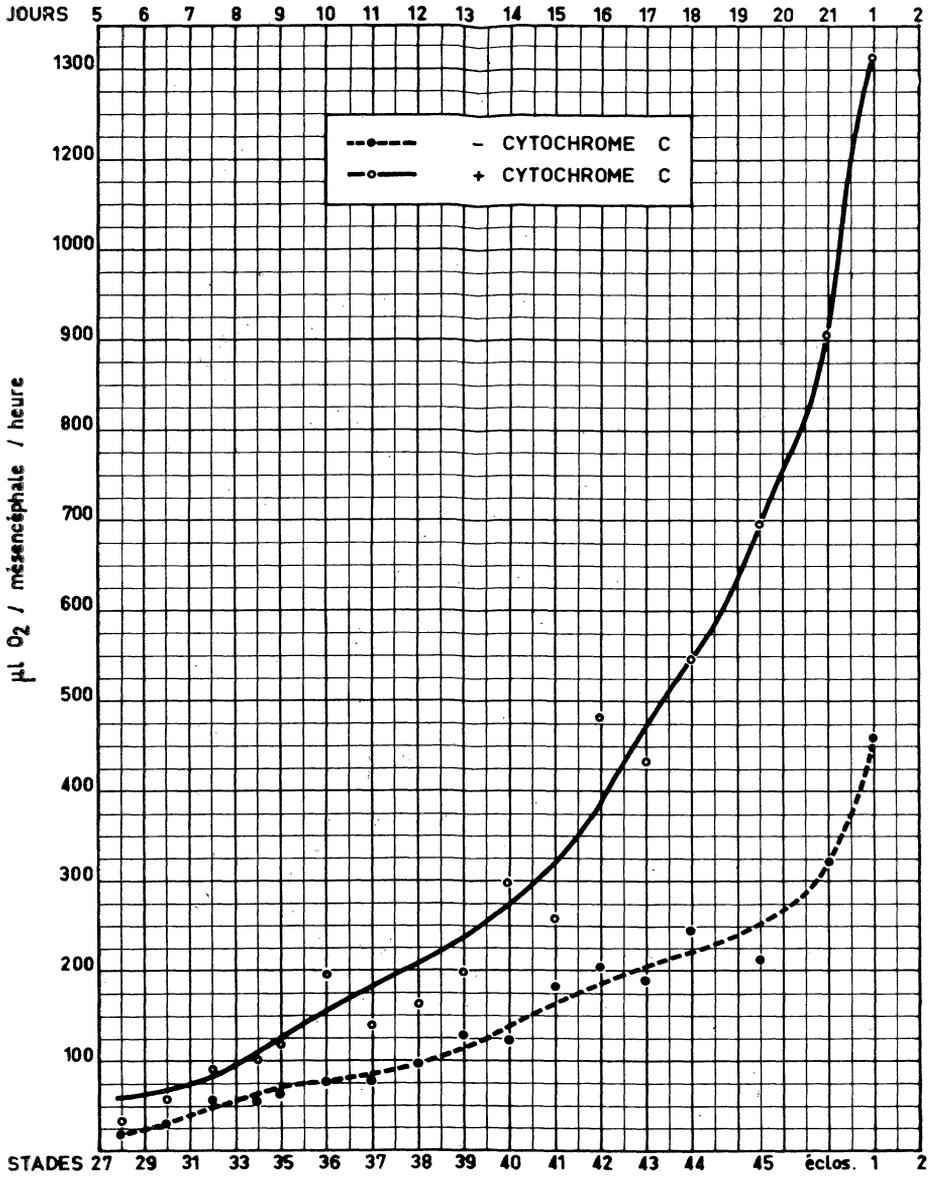
Les essais de mesures à partir du *stade* 25 que nous avons faits se sont soldés par des échecs. Les résultats sont extrêmement faibles, parfois nuls, peu cohérents. L'activité enzymatique est inférieure à la limite de sensibilité de la méthode. Au *stade* 30, l'activité enzymatique est encore extrêmement faible et le pourcentage d'erreur très grand ; nous sommes encore à la limite de sensibilité de la méthode et les valeurs obtenues d'une expérience à l'autre sont assez différentes, bien que la détermination des stades embryonnaires ait été effectuée avec soin.

A partir du *stade* 36, les valeurs sont beaucoup plus constantes ; la partie significative de la courbe s'amorce donc à ce stade. L'activité de la succinoxydase est exprimée en μ l d'O₂ consommé par mg d'N tissulaire et par heure. La consommation d'oxygène en présence de succinate seul reste sensiblement constante durant toute la vie embryonnaire. Par contre, l'addition de cytochrome c à une concentration optimum provoque, à partir du *stade* 40, une augmentation relativement

T A B L E A U 3

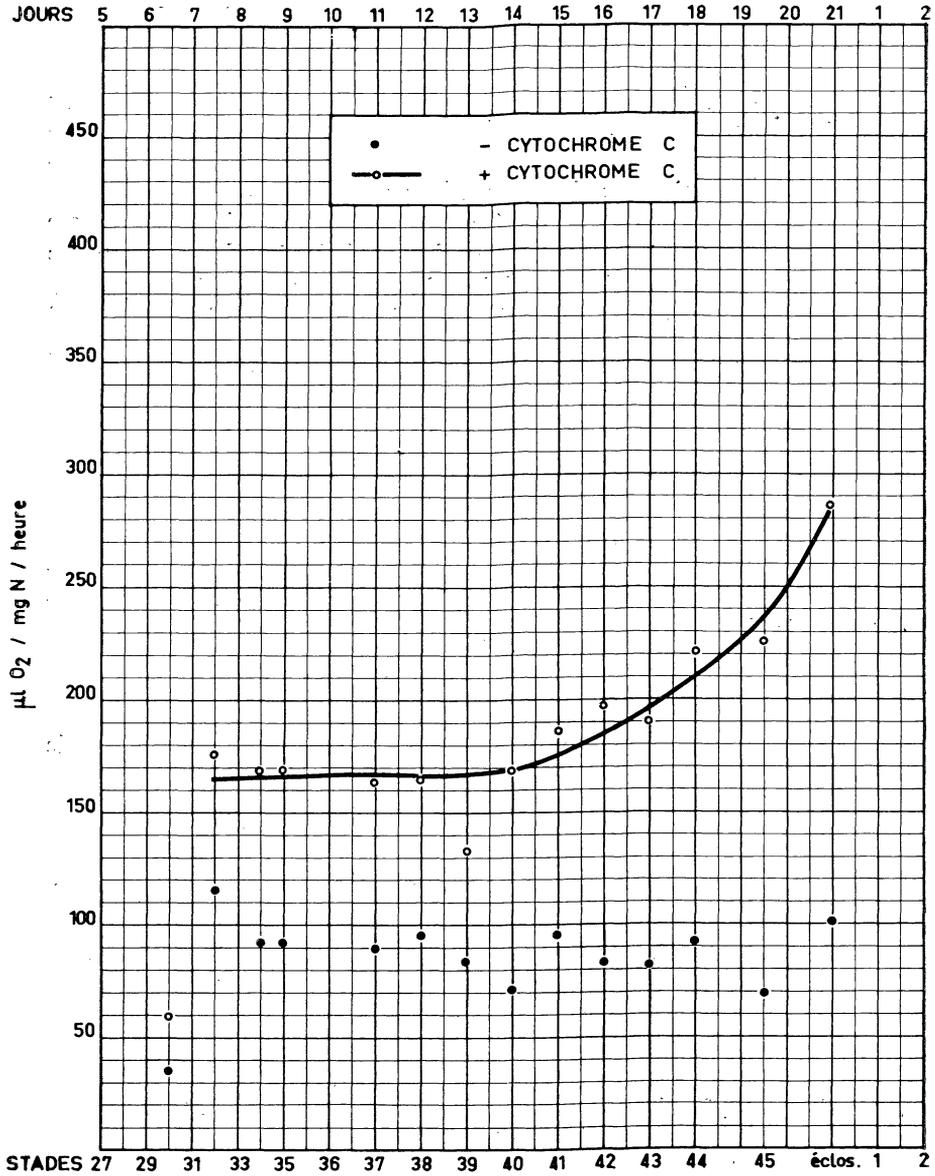
EVOLUTION DE L'ACTIVITE DE LA SUCCINOXYDASE

Stades	28	29	32-33	34	35	36	37	38	38-39	40	41	42	43	44	45	éclos	1j.	2j.
Jours	5 1/2	6 1/2	7 1/2	8 1/2	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19-20	"	"	"
μ l O ₂ consommé par mg N tissulaire et par heure		35 +10	115 +8	93 +8	91 +19		89 +9	95 +6	84 +7	71 +3	95 +2	83 +9	81 +4	91 +3	68 +9	101 +2	74 +2	80 +4
		59 +2	176 +18	169 +16	168 +8		163 +12	162 +6	132 +9	169 +7	185 +5	196 +7	189 +10	221 +12	224 +11	287 +5	208 +9	262 +22
μ l O ₂ consommé par mésoécéphale et par heure	21 +2	31 +12	56 +7	54 +9	64 +5	77 +25	76 +10	99 +7	126 +11	122 +14	184 +18	203 +39	187 +17	245 +11	212 +18	320 +6	459 +15	272 +13
	33 +1	57 +4	92 +9	101 +14	118 +19	197 +29	140 +10	164 +10	198 +13	299 +29	257 +65	481 +43	434 +31	548 +29	696 +11	902 +17	1312 +55	886 +74



GRAPHIQUE 3

Développement de l'activité du système de la succinoxydase des lobes optiques de l'embryon de Poulet.



GRAPHIQUE 4

Activité du système de la succinoxydase par mg d'azote tissulaire dans les lobes optiques de l'embryon de Poulet.

faible du taux de la consommation d'O₂, qui passe de 168,8 µl d'O₂/mg N/heure au 14^e jour du développement à 286,6 µl d'O₂/mg N/heure à l'éclosion.

Lorsqu'on exprime la consommation d'oxygène non plus en la rapportant à l'azote total du tissu, mais au mésencéphale total, on constate que la courbe de consommation d'oxygène est sensiblement parallèle à la courbe de croissance tissulaire. Nous avons pu le vérifier puisque le rapport entre les deux données : consommation d'oxygène, azote total du tissu, est constant jusqu'au *stade* 43. L'addition de cytochrome c à une concentration optimum révèle, à partir du *stade* 36, une augmentation progressive de l'activité du système de la succinoxydase qui ne devient appréciable qu'au *stade* 40. Du *stade* 36 au *stade* 40, elle passe de 196,9 µl à 299,4 µl et atteint à l'éclosion 902,5 µl d'O₂.

3. — DISCUSSION.

Bien que les premières mesures significatives aient été obtenues à des stades relativement tardifs, nous avons décelé une activité du système de la succinoxydase à des stades précoces. Les techniques histochimiques ont permis de déceler la succinoxydase dans les cellules différenciées, possédant des neurofibrilles.

La concentration de la succinodéshydrogénase dans un tissu peut être considérée comme le paramètre du métabolisme oxydatif et de l'activité métabolique générale (FRIEDE, 1959). L'augmentation de l'activité de la succinodéshydrogénase reflète l'augmentation de la consommation d'oxygène au cours du développement.

En se reportant aux mesures biochimiques effectuées, on peut constater que l'activité du système enzymatique oxydatif devient progressivement plus grande à partir du 10^e jour du développement. GAYET (1955) étudie les relations existant entre la croissance biochimique et la consommation d'oxygène. Du *stade* 25 au *stade* 35, la consommation d'oxygène rapportée à l'unité de base, l'azote total tissulaire, demeure pratiquement constante ; cette période correspond à l'activité mitotique du tissu. Au *stade* 36, lorsque la multiplication cellulaire s'est arrêtée, la consommation d'oxygène ne cesse de croître régulièrement jusqu'à l'éclosion. O'CONNOR (1950), dans un travail concernant, d'une part le taux de respiration, d'autre part la glycolyse aérobie dans le mésencéphale entre le 3^e et le 8^e jour du développement du Poulet, trouve une relation linéaire entre la formation présumée d'acide lactique (glycolyse aérobie) et l'activité mitotique. Il montre que l'inhibition de la glycolyse aérobie par du fluorure de sodium ou de l'iodo-acétate

de sodium retentit sur la division cellulaire sans altérer les mécanismes de la respiration. La respiration (consommation d'oxygène) semble indépendante de cette activité. LÖVTRUP (1953) note, au cours du développement embryonnaire de *Rana temporaria*, que le taux de la consommation d'O₂ est constant durant toute la phase d'intense synthèse d'ADN des stades blastula et neurula. ZEUTHEN (1951) avait montré précédemment que le taux de respiration augmente linéairement durant l'interphase et s'abaisse lors de la division cellulaire. Poursuivant ces recherches, GAYET montre que l'azide de sodium, qui intervient dans le découplage des oxydations et des phosphorylations au niveau du cycle de Krebs, permet de mettre en évidence une augmentation du taux des mécanismes oxydatifs au 9^e ou 10^e jour du développement des lobes optiques. En effet, du stade 26 au stade 36, le pourcentage d'inhibition est sensiblement constant (soit environ 10 %), alors qu'il s'accroît graduellement du stade 36 à l'éclosion (il atteint 31 % au stade 46). La comparaison entre le Q O₂ par milligramme de P-ADN avec le pourcentage d'inhibition de Q O₂ par l'azide suggère qu'à partir du 9^e jour un système enzymatique intervient dans les mécanismes respiratoires. Déjà on a pu montrer que le cerveau indifférencié semblait peu sensible à l'oxygène, c'est ainsi que le cerveau du Rat nouveau né peut résister plus longtemps à une anoxie prolongée que celui du Rat adulte. Il est également moins sensible à un arrêt de la circulation. Le malonate qui inhibe la respiration dans le cerveau du Rat adulte en inhibant la succinodéshydrogénase, a peu d'effet sur le Rat nouveau né. La sensibilité au malonate augmente au cours des 10 jours qui suivent la naissance (TYLER, 1942).

Les données que nous avons recueillies sont en accord avec ces résultats. L'effet du cytochrome c, en stimulant l'oxydation du succinate, suggère que le système de la succinoxydase est lié à l'O₂ par l'intermédiaire de la chaîne des électrons (SLATER, 1958). Déjà FLEXNER (1950-1955) montrait que le taux de respiration tissulaire demeure constant chez l'embryon de Cobaye, ainsi que l'activité de la cytochrome-oxydase, et concluait que le facteur déterminant l'augmentation d'activité est le cytochrome c.

En ce qui concerne les processus de respiration oxydative, le cerveau contient peu de cytochrome oxydase et de cytochrome c au cours des premiers jours du développement (FLEXNER et coll., 1941 ; FLEXNER et FLEXNER, 1946). Les auteurs observent une augmentation simultanée de l'activité de la cytochrome-oxydase, de l'ATP-ase et de la succinodéshydrogénase.

Une augmentation semblable de l'activité de la succinoxydase a été observée dans le cerveau du Rat par POTTER, SCHNEIDER et LIEBL (1945) ;

mais le Rat ayant un développement plus tardif, l'augmentation ne débute que quelques jours après la naissance. L'augmentation de l'activité succinoxydasique, à partir d'un certain stade, annonce probablement le passage du mécanisme de la glycolyse anaérobie prédominant chez l'embryon (O'CONNOR, 1950) au mécanisme de la glycolyse aérobie propre à l'adulte. RICHTER (1957) avait déjà observé que c'est au cours du développement que s'établissait la prédominance de la glycolyse aérobie. Le seul substrat utilisé *in vivo* comme source d'énergie semble être le glucose. Pour RICHTER, la barrière sang-cerveau n'arrêterait pas complètement l'entrée des métabolites, elle agirait plutôt en réduisant considérablement leur taux de pénétration. Déjà, OCHOA (1941) constatait que le schéma de la glycolyse de EMBDEN-MEYERHOF se vérifie, et COXON et coll. (1949) mettaient en évidence le cycle de l'acide citrique dans le tissu nerveux. Le métabolisme du glucose dans le cerveau serait le même que dans les autres tissus.

Au cours des *premiers stades*, et ceci jusqu'au *stade* 36-38, l'activité de la succinodéshydrogénase est localisée au niveau des corps cellulaires sur de fins granules correspondant vraisemblablement aux mitochondries. On ne l'observe que dans la substance grise et peu dans la substance blanche. Ceci est en accord avec les observations de SHIMIZU et MORIKAWA (1957).

A partir du *stade* 38, l'enzyme apparaît dans le neuropile et les couches plexiformes. Cette activité enzymatique du neuropile s'accroît au *stade* 40 : les couches plexiformes ont alors une réaction sensiblement égale, parfois supérieure, à celle des couches cellulaires. La localisation de l'activité enzymatique dans le neuropile, les couches plexiformes, glomérulaires et moléculaires au moment où les processus neuraux se sont définitivement constitués, déjà constatée par FRIEDE (1959), est en rapport avec la richesse de ces zones en terminaisons synaptiques ; les mitochondries, qui contiennent la presque totalité de la succinoxydase présente dans le cytoplasme (HOGEBOOM et coll., 1946 ; BRODY et coll., 1952) sont concentrées dans les arborisations terminales de l'axone (POPE, 1955 ; PALAY, 1956 b) ; PALADE et coll., 1959). L'axone ne contient que peu de mitochondries, celles-ci sont agglomérées aux nœuds de Ranvier (GASSER, 1952). FRIEDE (1959 b) montre que l'on décèle une activité de la succinodéshydrogénase au niveau du nœud de Ranvier. Pour cet auteur, cette localisation suggérerait que l'enzyme joue un rôle dans le métabolisme de la membrane au niveau du nœud de Ranvier.

VIII. - Les Cholinesterases

1. — RÉSULTATS HISTOCHIMIQUES.

Au *stade* 25, les cellules de la zone épendymaire, pour la plupart en mitose, et les cellules du manteau ne montrent aucune activité enzymatique (Fig. 22). Mais dans la zone externe, toutes les cellules ont une réaction AChE positive, localisée dans le cytoplasme.

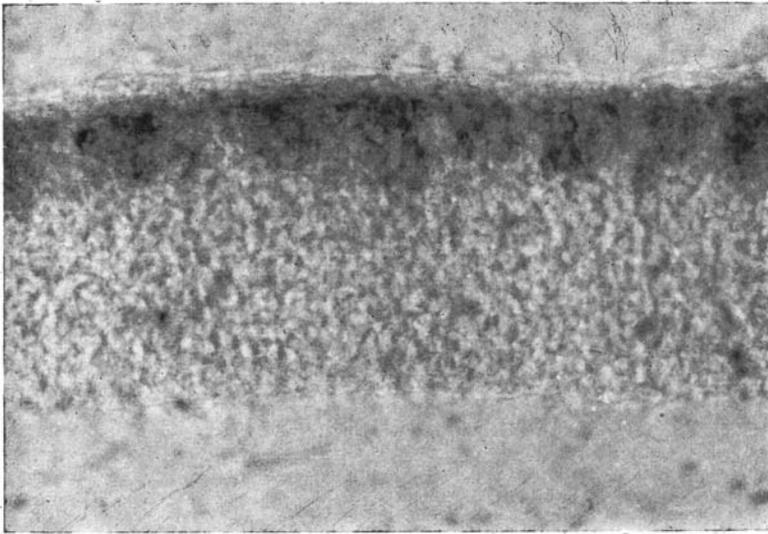


FIGURE 22

Activité AChE au niveau des lobes optiques de l'embryon de Poulet. Stade 25 (4-4 jours $\frac{1}{2}$). Coupe frontale. Incubation : 18 heures à pH 6,8. \times 150.

Aux *stades suivants*, l'aspect de la couche neuroblastique interne est celui de la couche unique décrite au *stade* 25 ; seules les cellules les plus externes sont riches en AChE. Des neuroblastes de cette zone enzy-

matiquement active migrent dans la couche fibreuse et forment de courtes colonnes de cellules à réaction AChE positive.

Au *stade* 31, la migration s'est poursuivie et a abouti à la formation des quatre couches A, B, C, D. La couche fibreuse externe (couche A) qui reçoit les premières terminaisons des fibres du nerf optique est négative ; la couche neuroblastique externe (couche B) est formée de nombreuses cellules serrées, riches en AChE ; la couche fibreuse profonde ne possède aucune activité enzymatique au niveau des fibres, seules les cellules en transit dans cette région, cellules provenant de la couche germinative, sont riches en AChE ; la couche neuroblastique externe, plus mince qu'aux stades précédents, ne possède de cellules AChE positives que dans sa périphérie. La stratification amorcée s'est poursuivie.

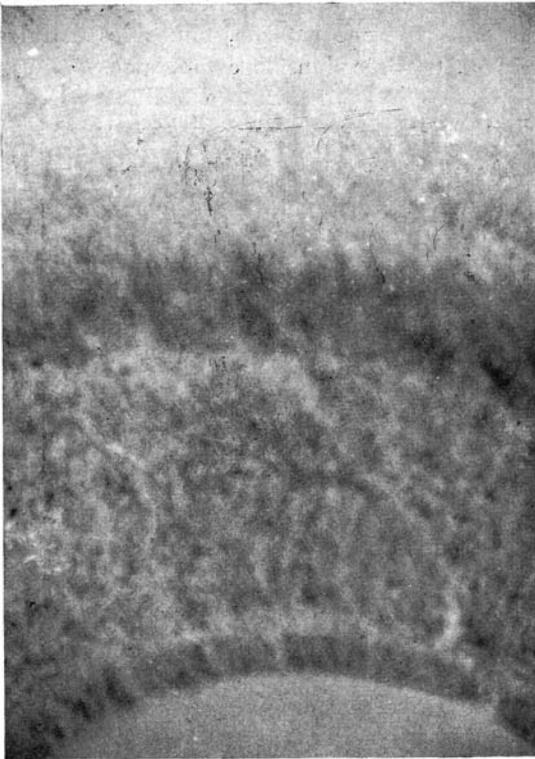


FIGURE 23

Activité AChE au niveau des lobes optiques de l'embryon de Poulet. Stade 34 (8 jours). Coupe frontale. Incubation : 18 heures à pH 6,8. $\times 110$.

Au *stade* 34, l'activité AChE a augmenté dans le cytoplasme des cellules (Fig. 23). La couche 1, couche des fibres du nerf optique, est négative. Les couches 2, 3, et 4, couches cellulaires, ont une activité AChE importante. C'est dans la couche 4, au niveau des neuroblastes

bien développés, mais dispersés, que la réaction est la plus intense. La couche fibreuse interne, couche 5, a une réaction négative ; seules les rares cellules qui la traversent ont de l'AChE ; la couche 6, de substance grise centrale, très mince, peu différenciée, a une réaction AChE plus faible. Dans la couche 7, couche germinative, seules les cellules externes sont positives.

A partir du *stade* 36, la stratification, nous l'avons vu, se localise dans les couches 1 et 2, stratification due, d'une part, à la migration centrifuge des neuroblastes, d'autre part à la formation de couches plexiformes (Fig. 24). Jusqu'au *stade* 39, on n'observe de réaction positive que dans

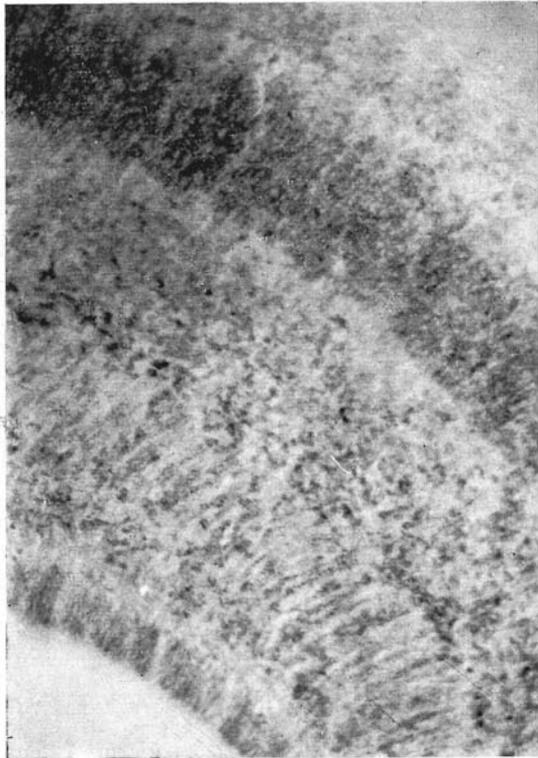


FIGURE 24

Activité AChE au niveau
des lobes optiques de
l'embryon de Poulet.
Stade 36 (10 jours).
Coupe frontale. Incuba-
tion : 18 heures à pH
6.8. $\times 110$.

les couches cellulaires ; aucune activité enzymatique n'est décelable dans les couches plexiformes. Toutefois, dans la couche ganglionnaire (couche 4), où les neuroblastes sont particulièrement différenciés, il est possible d'observer de l'AChE dans les prolongements. La couche 7, qui perd toute activité mitotique au *stade* 36, conserve, dans sa zone périphérique, des cellules à réaction AChE positive. Les cellules voisines

de l'épendyme ont une réaction AChE négative ; par contre, on y décèle de la cholinestérase non spécifique.

A partir du *stade* 40, un changement apparaît dans l'aspect des lobes optiques. Jusqu'alors, les strates cellulaires contrastaient par leur forte activité hydrolysante avec les strates fibreuses ou plexiformes qui ne possédaient d'activité enzymatique qu'au niveau de rares cellules dispersées (Fig. 25). L'activité AChE apparaît maintenant dans les couches plexiformes ; la stratification n'est discernable qu'à l'aide de surcolorations.

La couche des fibres rétiniennes est incolore. Au-dessous, la couche 2α a une très forte activité AChE, la couche 2β une activité faible ; toutes deux sont des zones plexiformes. 2γ , strate cellulaire, conserve l'activité enzymatique qu'elle présentait aux stades précédents. La

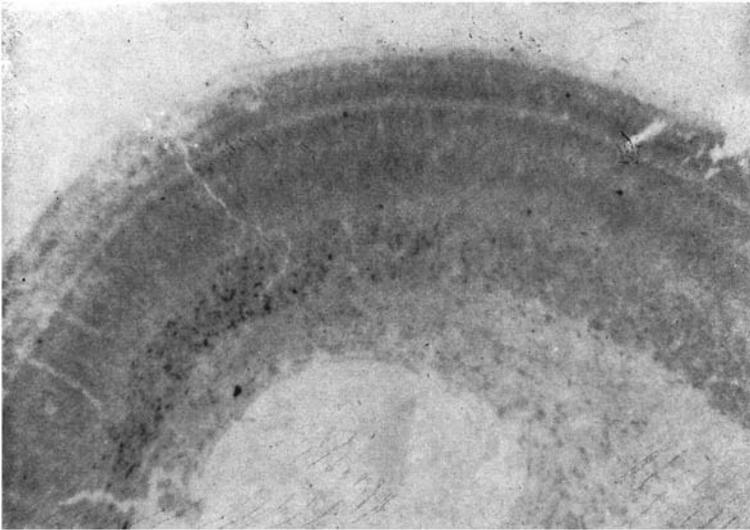


FIGURE 25

Activité AChE au niveau des lobes optiques de l'embryon de Poulet. Stade 45 (20 jours). Coupe frontale. Incubation : 1 h. 30 à pH 6,2. $\times 45$.

strate 2δ qui se forme au *stade* 40, est totalement dépourvue d'activité AChE ; c'est une zone plexiforme. Les couches cellulaires $2a$ et 3 ont une forte activité AChE, localisée non seulement dans les corps cellulaires, mais également au niveau des plexus qui les enveloppent. Les gros neurones ganglionnaires de la couche 4 sont très positifs ; ils contras-

tent avec le plexus fibreux peu coloré. Les couches 5, 6 et 7 qui présentaient une réaction AChE positive, semblent avoir une moins grande activité. Par contre, dans la couche épendymaire (couche 7), l'activité ChE observée précédemment subsiste.

A l'éclosion, cette évolution s'accroît ; un certain nombre de couches — 1, 2 δ , et 7 — sont définitivement négatives ; les cellules de la couche 2a, voisine de 2 δ , ont perdu une partie de leur activité AChE. Par contre, la couche 2 β , qui n'était que faiblement positive, montre une réaction plus intense. Dans l'ensemble des couches positives, l'activité AChE a considérablement augmenté, la réaction est déjà très intense après 30 minutes d'incubation.

L'activité ChE persiste dans les cellules de la couche 7.

2. — RÉSULTATS BIOCHIMIQUES.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 4 et les graphiques 5 et 6.

Au *stade* 29 (5 j. 1/2), l'activité enzymatique est déjà manifeste (217,5 \pm 42,8 μ l CO₂ dégagés par mg d'azote par heure) ; pourtant, l'hydrolyse est faible et les différentes mesures effectuées donnent des résultats inconstants.

Aux *stades suivants*, les résultats sont plus nets ; l'activité cholinestérasique croît légèrement d'un stade à l'autre de façon régulière jusqu'au *stade* 35 (9 j.) où elle atteint sensiblement une valeur double de celle obtenue au *stade* 29 (404,7 \pm 47,4 μ l de CO₂). L'activité a donc doublé en 4 j. 1/2.

Du *stade* 35 au *stade* 40 (674 \pm 23,5 μ l de CO₂), l'activité de l'enzyme passe, en 5 jours, à trois fois sa valeur initiale, ce qui marque une augmentation de cette activité par rapport aux stades précédents. La courbe s'infléchit de façon régulière.

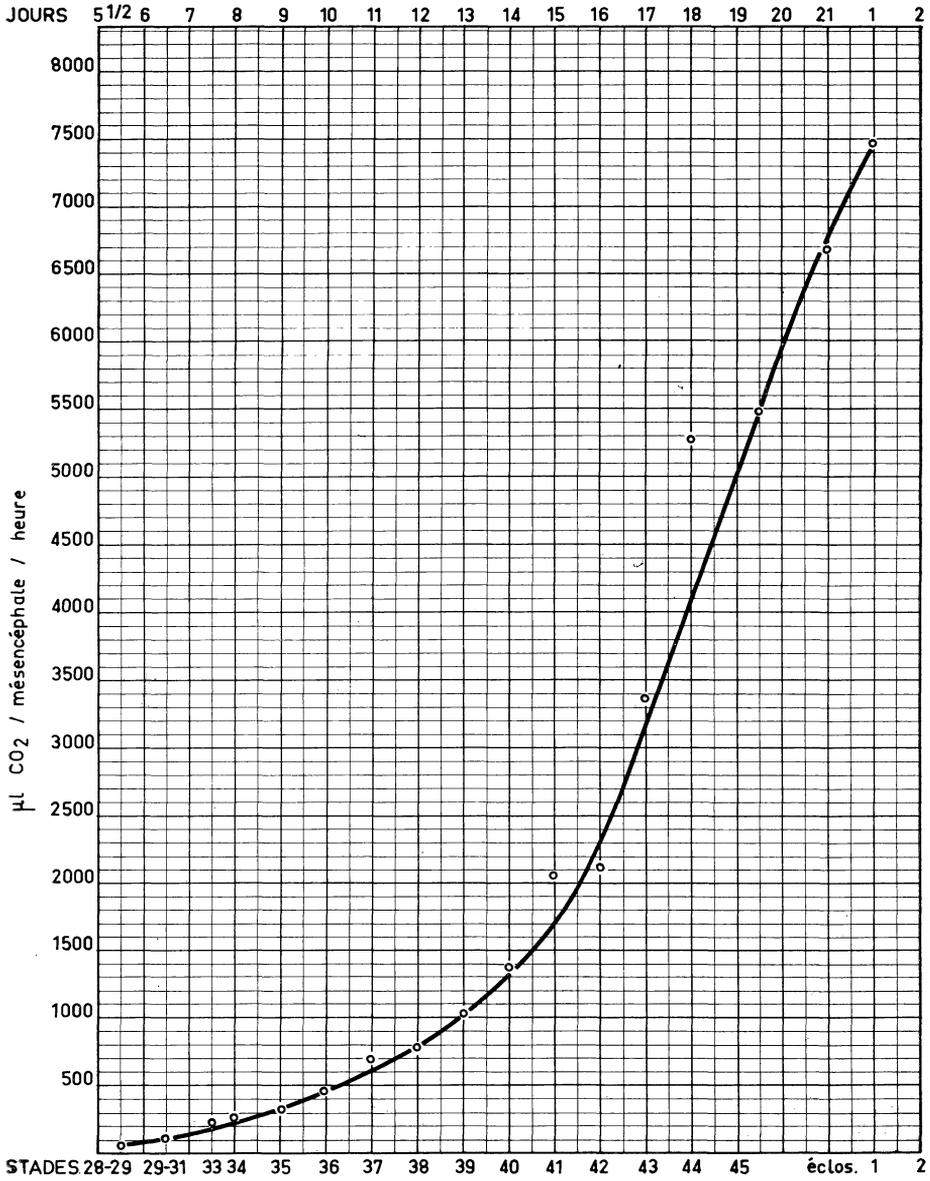
A partir du *stade* 40, l'hydrolyse enzymatique croît très rapidement et régulièrement pour atteindre à l'éclosion neuf fois sa valeur initiale.

Lorsque l'on rapporte l'activité cholinestérasique non plus à l'azote tissulaire, mais au mésencéphale, l'augmentation est évidemment beaucoup plus caractéristique. Du *stade* 28 à l'éclosion, l'activité est multipliée par 156.

T A B L E A U 4.

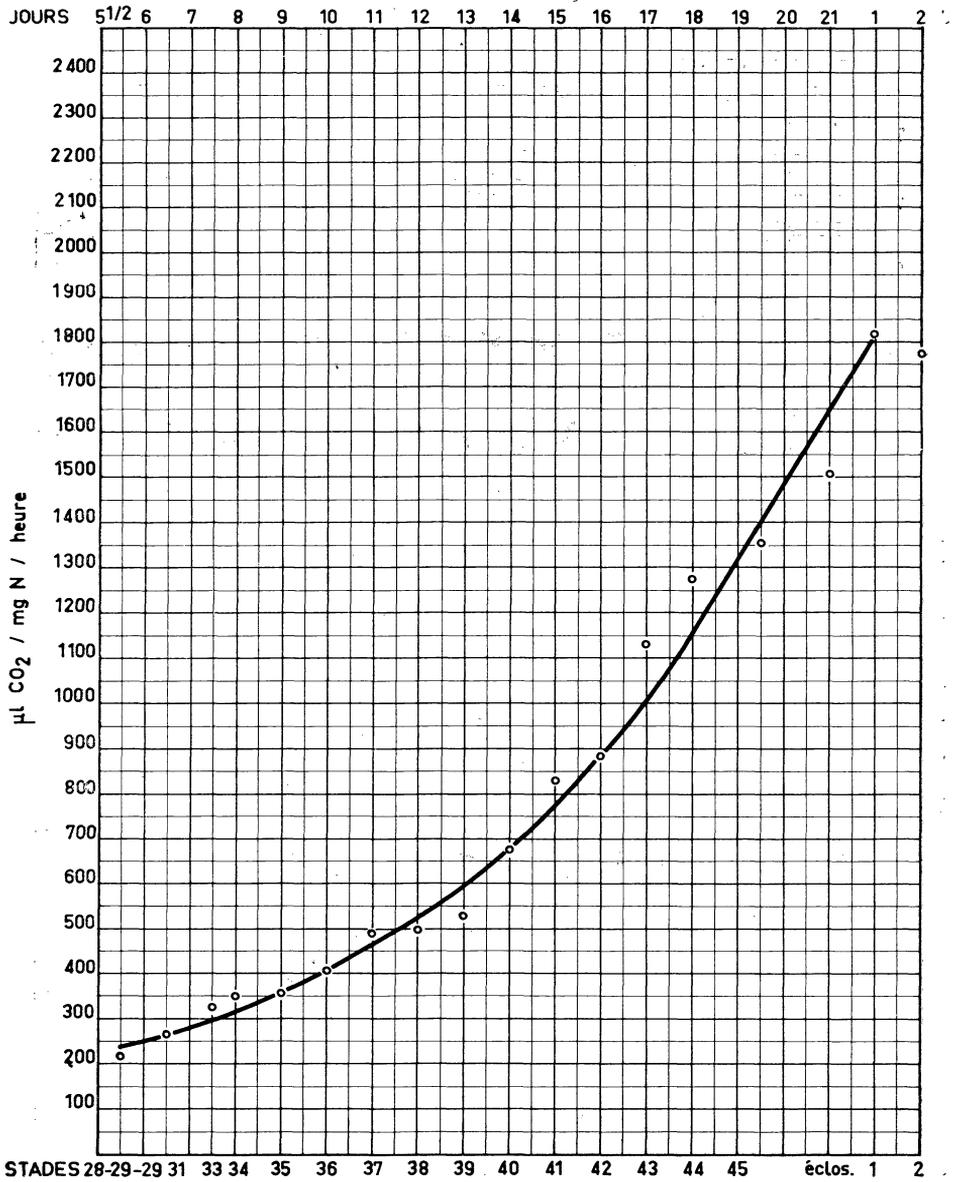
EVOLUTION DE L'ACTIVITE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE

Stades Jours	28-29 5 1/2-6	29-31 6-7	33 7-8	34 8	35 9	36 10	37 11	38 12	39 13	40 14	41 15	42 16	43 17	44 18	45 19-20	éclos 21	1j. 1	2j. 2
ml CO ₂ par mg N et par heure	217 +45	264 +50	324 +26	350 +14	355 +14	405 +47	489 +44	499 +35	525 +44	674 +23	829 +41	881 +58	1131 +24	1273 +84	1392 +142	1507 +45	1821 +31	1775 +116
ml CO ₂ dégagé par mésoosp. et par heure	47,6	118	220	259,2	329,8	449,1	691	788,5	1018,1	1374,3	2049,6	2100,3	3349,4	5268,7	5468	5665,6	7445,2	



GRAPHIQUE 5

Développement de l'activité de la cholinestérase
des lobes optiques de l'embryon de Poulet.



GRAPHIQUE 6

Activité de la cholinestérase par mg d'azote tissulaire dans les lobes optiques de l'embryon de Poulet.

3. — DISCUSSION.

De nombreux travaux concernant la localisation et l'activité de l'acétylcholinestérase dans le système nerveux ont été effectués ; on trouvera un exposé des recherches histochimiques dans la monographie de GEREBTZOFF, parue en 1959. Les données biochimiques sur le développement du mésencéphale ont été fournies par NACHMANSOHN (1938-1939) chez le Poulet, par BOELL et coll. (1955) chez *Rana pipiens*. SINDEN et SCHARRER (1949) localisent l'activité AChE dans les lobes optiques du Pigeon, par la technique de Gomori ; plus récemment FILOGAMO (1960) entreprend l'étude des cholinestérases des lobes optiques de l'embryon de Poulet après extirpation d'une ébauche oculaire. Simultanément ROGERS et coll. (1960) font paraître leurs résultats concernant la différenciation biochimique dans diverses parties du cerveau de l'embryon de Poulet. Ces résultats confirment les nôtres (BONICHON, 1958-1960).

La courbe évolutive de l'activité AChE permet de mettre en évidence deux périodes caractéristiques dans le développement des lobes optiques. La première, qui se situe entre les *stades* 35 et 39, est caractérisée par une augmentation nette des taux d'activité AChE, la seconde, qui débute au *stade* 40, correspond à une augmentation beaucoup plus importante de l'activité enzymatique.

Les cellules destinées à devenir des neurones synthétisent très tôt l'AChE, dès que les neuroblastes atteignent la limite périphérique de la couche germinative ; le nucléole, et a fortiori les corps de Nissl ne sont pas encore différenciés. A ce moment, les caractères de ces cellules sont assez peu précisés, seule la présence de neurofibrilles permet de les définir sans hésitation comme des neuroblastes. FILOGAMO (1960) observe déjà l'enzyme au *stade* 20. On peut donc conclure qu'une enzyme aussi étroitement liée à l'activité fonctionnelle spécifique apparaît bien avant qu'une rôle défini lui soit attribué.

D'après ZACKS (1954), l'apparition de l'enzyme serait même antérieure à la différenciation neuroblastique. Il faut toutefois préciser que pour lui, la différenciation neuroblastique se situe aux environs du *stade* 20, alors que la plupart des auteurs reconnaissent l'apparition de formations neurofibrillaires dès le *stade* 10 ou 12. L'AChE est présente dans des cellules qui ne possèdent pas encore de prolongements cytoplasmiques leur permettant des contacts synaptiques. Ce caractère de précocité de l'enzyme se retrouve dans les myoblastes où une activité AChE de la cellule est décelée alors même qu'aucune terminaison nerveuse ne l'a atteinte (BONICHON, 1957 ; GEREBTZOFF, 1957).

Dans ces stades précoces, l'enzyme est diffuse dans la totalité du cytoplasme ; c'est là encore un caractère commun au neuroblaste et au myoblaste ; dans ce dernier, l'enzyme ne se concentre au niveau de la plaque neurale que lorsque les terminaisons des fibres nerveuses motrices viennent à son contact (BONICHON, 1957). SHEN et coll. (1956) montrent que l'enzyme est présente dans les cellules ganglionnaires de la rétine de Poulet dès le 4^e jour d'incubation et que l'AChE se localise à la surface postsynaptique indépendamment de l'établissement de rapports avec les fibres présynaptiques. Dans les lobes optiques ce n'est qu'à partir de stades différenciés, du *stade* 36, mais surtout des *stades* 38 à 40, que l'activité AChE se concentre sur la membrane cellulaire. Nous avons nettement observé ce déplacement de l'enzyme dans les neuroblastes de la corne antérieure de la moelle (BONICHON, 1958) ; moins net, il est plus tardif dans le mésencéphale où le processus est soumis au gradient antéro-postérieur de différenciation du tube neural.

GIACOBINI (1959) étudie la localisation et l'activité AChE de neurones isolés, en particulier de neurones de la corne antérieure de la moelle. Si la concentration sur la membrane cellulaire est élevée, on décèle également une activité enzymatique dans le cytoplasme, le carboxyplasma et la membrane nucléaire.

L'acquisition d'une activité AChE dans les expansions nerveuses est tardive dans le mésencéphale. Les couches plexiformes ne deviennent positives qu'au *stade* 40, c'est-à-dire lorsque les contacts synaptiques définitifs sont établis. L'enzyme est située sur les dendrites et peut-être également sur l'axone. Ainsi que le remarque FILOGAMO (1960), l'enchevêtrement des fibres à ce niveau ne permet pas de préciser sur quelles structures se localise l'activité enzymatique. Toutefois, il est certain que les fibres afférentes provenant de la rétine sont dépourvues d'enzyme, la couche externe des lobes optiques demeurant négative à la réaction durant tout le développement. Contrairement à FILOGAMO, nous observons par contre une légère positivité de la couche fibreuse profonde, lieu d'accès des fibres de la sensibilité générale. L'une des strates de la zone des terminaisons des fibres du nerf optique, la couche 2δ (couche 5 de Cajal) demeure négative ; cette exception est notée également par FILOGAMO (1960). POPE (1952) décrit une couche semblable dans le cortex cérébral du Rat. Dans l'état actuel de nos connaissances, ce fait est difficile à expliquer, peut-être l'enzyme est-elle située à distance des corps cellulaires, sur l'extrémité des prolongements dendritiques. Il est possible également que la conduction nerveuse à ce niveau ne soit pas cholinergique. GEBERTZOFF (1959) établit qu'au niveau des cellules de Purkinje du cervelet, les axones des grains cérébelleux en contact avec la ramure dendritique des cellules de Purkinje sont cholinergiques, alors que les synapses entre l'axone des cellules à corbeille et

le corps des cellules de Purkinje ne montrent pas d'activité AChE. PONCELET (1960) dans la corne d'Ammon trouve un nouvel exemple de convergence de fibres cholinergiques et non cholinergiques sur des cellules du système nerveux central, et conclut qu'une même cellule peut ainsi être soumise à plusieurs médiateurs, l'un transmettant l'activation, l'autre l'inhibition. Ainsi l'ACh pour l'effet activateur et l'acide γ -aminobutyrique pour l'effet inhibiteur.

On peut difficilement préciser si, dans les dendrites, l'enzyme est synthétisée sur place ou si elle se forme dans les corps cellulaires et se déplace ; on a montré que dans l'axone les modalités sont celles d'un entraînement de l'enzyme vers les arborisations terminales. Au cours d'une étude portant sur la myélinisation de fibres nerveuses périphériques, nous avons pu montrer que l'enzyme, tout d'abord diffuse tout au long de l'axone, se concentrait à son extrémité avec la formation de la gaine de myéline (BONICHON et GEREBTZOFF, 1958).

Nous avons mis en évidence une activité de la cholinestérase non spécifique dans la couche ventriculaire. Celle-ci n'apparaît que lorsque les cellules ont perdu leur activité mitotique, à partir du stade 36. Cette localisation de la ChE dans la couche épendymaire est à rapprocher de la forte activité de la cholinestérase non spécifique des plexus choroïdes.

IX. - Discussion générale

Nous avons tenté, dans l'introduction de ce travail, de mettre en évidence les relations entre divers processus chimiques du développement embryonnaire, ceux-ci étant impliqués dans les mécanismes de prolifération, croissance, différenciation et activité fonctionnelle du tissu nerveux. Notre but, à la suite de cet exposé, est de rechercher les corrélations qui peuvent exister au cours de l'évolution embryonnaire entre ces processus et des données d'ordre morphologique et physiologique. FLEXNER (1950 - 1955), étudiant le développement du cortex cérébral du Cobaye, relie des observations cytologiques, chimiques, métaboliques, et est amené à reconnaître une phase critique qui correspond à l'apparition d'une activité fonctionnelle.

Prolifération, croissance, migration, différenciation, apparition d'une activité fonctionnelle ne se succèdent pas suivant un ordre chronologique dans le développement du tissu nerveux, mais s'intriquent. Les premiers caractères observables expérimentalement sont d'ordre morphologique. Jusqu'au *stade* 30, c'est la multiplication cellulaire qui prédomine ; si elle se prolonge jusqu'au *stade* 35, c'est à un rythme beaucoup plus lent. Les données de tous ordres que nous avons recueillies — taux d'azote total, dosage du P-ADN (GAYET et SCHWANDER, 1954), examen cytologique — confirment toutes cette évolution. En même temps, la migration de cellules, puis de groupes de cellules contribue à l'élaboration de la structure stratifiée caractéristique des lobes optiques. HOADLEY (1924) constatait que le mésencéphale d'un embryon de 8 jours offrait une structure semblable à celle d'un Poulet adulte. Nous devons préciser que ceci n'est vrai que dans les grandes lignes : nous avons pu constater que jusqu'au 12^e jour, la différenciation des strates se poursuit en direction centrifuge dans la zone des terminaisons des fibres du néff optique, des couches cellulaires très minces alternant régulièrement avec des zones plexiformes. Cette différenciation architectonique relativement tardive résulte du mode de croissance des arborisations cytoplasmiques, décrit par CAJAL (1911) : les premières arborisations, généralement transitoires, s'atrophient ; le développement des dendrites définitives est

vraisemblablement un processus contrôlé par des influences périsomatiques, déterminantes dans la phase qui précède l'apparition d'une activité fonctionnelle.

Alors même que la prolifération cellulaire est encore dans une phase d'activité intense, la différenciation s'est déjà amorcée. Elle concerne l'organisation de la substance cytoplasmique, vraisemblablement de protéines de structure que l'on met en évidence dans le neuroblaste sous l'aspect de neurofibrilles ; bien qu'il soit admis qu'il s'agisse d'un caractère morphologique, il faut déjà y voir une différenciation biochimique. Les neurofibrilles apparaissent dans des cellules qui ne sont pas absolument indifférenciées : leur localisation périphérique, l'aspect de leur noyau les distinguent des cellules de la zone du manteau (le noyau est plus sphérique, la chromatine forme des amas dispersés mais plus nombreux que dans les noyaux des médulloblastes). Au *stade* 25, nous avons pu déceler dans ces neuroblastes une légère activité succinoydasique et acétylcholinestérasique. Ces cellules ont une basophilie cytoplasmique faible mais pourtant plus élevée que les médulloblastes.

L'apparition d'un nucléole typique, légèrement ARN positif, n'a lieu que plus tard, au *stade* 29-30, dans des cellules qui sont déjà nettement différenciées, cette différenciation étant accompagnée d'une augmentation de la taille du noyau et de la basophilie cytoplasmique.

Jusqu'au *stade* 35, l'aspect du neuroblaste ne subit pas de changements notables ; son évolution est caractérisée par une augmentation progressive des caractères portant sur le développement des neurofibrilles et sur l'accroissement de taille nucléaire, nucléolaire et cellulaire total ; l'ARN nucléolaire et cytoplasmique augmente. Les activités enzymatiques que nous avons étudiées suivent la même évolution. Seule l'activité de la phosphatase alcaline diffère, elle augmente considérablement, se localise dans le cytoplasme au *stade* 34. Au cours de cette phase, bien que la croissance tissulaire extrêmement rapide soit en partie une conséquence de la prolifération cellulaire, on constate que l'arrêt de synthèse d'ADN se manifestant au *stade* 36 ne retentit nullement sur la synthèse du protoplasme cellulaire. Par contre, jusqu'au 10^e jour du développement, la consommation d'oxygène est fonction linéaire de la synthèse de protoplasme (GAYET, 1955).

Le *stade* 36 correspond à une évolution de la cellule nerveuse tant au point de vue histologique que biochimique. L'ARN augmente nettement dans le cytoplasme des neurones de la couche ganglionnaire (couche 4) en rapport avec l'apparition des corps de Nissl ; la taille du noyau de ces cellules croît ainsi que celle du nucléole (le diamètre des noyaux passe de 12,8 μ à 15,8 μ entre les *stades* 36 et 37). Les données concernant la différenciation biochimique montrent que la croissance

tissulaire se poursuit ; toute activité mitotique ayant cessé, elle ne concerne donc plus que l'augmentation de taille des cellules et la synthèse de matériel spécifique. En effet, c'est lorsque les corps de Nissl se différencient que l'on met en évidence le début d'une augmentation de l'activité du système de la succinoxydase et de l'activité de l'acétylcholinestérase. Récemment, TEWARI et BOURNE (1962) ont montré qu'il existait une relation morphologique étroite entre l'ARN et l'acétylcholinestérase.

S'il ne nous a pas été possible de saisir l'apparition précoce de l'activité de la succinodéshydrogénase et de l'acétylcholinestérase dans les lobes optiques, les résultats que nous avons obtenus ne nous en apportent pas moins des indices précieux pouvant nous permettre de situer approximativement le stade de cette différenciation biochimique par rapport à la différenciation morphologique. Dans la couche unique formant la paroi des lobes optiques jusqu'au 6^e jour du développement, les éléments constituant cette couche représentent divers état cytophysiologiques des médulloblastes : certains sont en période d'interphase mitotique, d'autres sont en voie de différenciation. Par contre, dans la zone externe, les cellules sont déjà différenciées, elles possèdent des neurofibrilles ; l'acétylcholinestérase et la succinodéshydrogénase sont présentes. Il est impossible alors de discerner entre la différenciation morphologique et la différenciation biochimique, celle qui apparaît en premier. Mais au *stade* 34, on constate que cette couche paraventriculaire ne possède plus aucune affinité pour l'argent. La différenciation neuroblastique ne s'effectue que dans les strates les plus externes, par contre les cellules périphériques de cette couche, que nous sommes obligés de nommer médulloblastes, possèdent une activité succinodéshydrogénasique et une activité acétylcholinestérasique. Ce serait là un point essentiel établissant qu'une différenciation biochimique spécifique précéderait la différenciation morphologique.

La comparaison des données concernant la consommation d'O₂ et le système de la succinoxydase d'une part, l'AChE d'autre part, montre que le *stade* 36 correspond à une période critique pour la cellule nerveuse. L'augmentation du métabolisme oxydatif est cependant plus faible que l'augmentation d'activité de l'acétylcholinestérase. Les résultats concernant le métabolisme oxydatif, significatifs d'une augmentation de la phosphorylation oxydative (ROBERTSON et BOYER, 1955), correspondent vraisemblablement, à partir du *stade* 36, à une synthèse accrue d'ATP dont une partie est utilisée comme source d'énergie nécessaire au processus de resynthèse de l'ACh. Les travaux de FLEXNER (1950 - 1955) montrent que, effectivement, le taux d'activité de l'ATPase augmente à partir du *stade* critique qui, chez le Cobaye, se situe aux environs du 42^e jour du développement.

Les enzymes respiratoires jouant un rôle fondamental dans la production d'énergie nécessaire à l'activité cellulaire, il n'est pas étonnant de découvrir une corrélation étroite avec des enzymes liées à l'activité spécifique. BOELL et coll. (1955) constatent que le développement de la cholinestérase ne dépend pas seulement d'un accroissement quantitatif du matériel cellulaire du mésencéphale (chez *Rana*), mais aussi d'un changement qualitatif du tissu résultant du développement de composantes enzymatiques.

En effet, la synthèse d'ACh par la choline acétylase requiert la présence de groupements phosphates riches en énergie. L'énergie dérivée de la glycolyse et de l'oxydation du glucose est utilisée pour la synthèse d'esters phosphates riches en énergie, indispensables à la synthèse de l'ACh et à d'autres processus liés à la fonction de la cellule nerveuse (RICHTER, 1952).

L'acétylcholinestérase est sans aucun doute le meilleur exemple illustrant la relation intime existant entre la différenciation fonctionnelle et le développement enzymatique au niveau du tissu nerveux. YOUNGSTRÖM (1938) et NACHMANSOHN (1939) montrent que l'augmentation de l'activité de la cholinestérase se situe au moment où le système nerveux devient actif. SAWYER (1943) met en évidence une simultanéité entre le développement neuromusculaire et l'accroissement d'activité de l'AChE : la concentration d'AChE, faible durant les stades de prémotilité d'*Amblystoma punctatum*, augmente de façon significative avec le stade de motilité de la larve. Chez *Amblystoma*, il existe un gradient morphologique d'activité de l'AChE, l'enzyme apparaissant tout d'abord dans la moelle, le cerveau postérieur puis gagnant le mésencéphale et enfin le télencéphale. DETWILER (1946 a, b) montre que dans le cerveau moyen l'augmentation de l'activité enzymatique coïncide avec la dominance mésencéphalique sur l'activité motrice. Le début de l'augmentation de l'activité AChE dans le mésencéphale du Poulet, au stade 36, associée à celle d'autres facteurs impliqués dans l'activité nerveuse, pourrait correspondre au passage d'un seuil d'activité fonctionnelle de la cellule. C'est à ce stade que PETERS et coll. (1958) notent les premiers signes d'une activité bioélectrique spontanée dans le mésencéphale de l'embryon de Poulet. L'AChE, localisée sur les corps cellulaires, interviendrait pour accroître la perméabilité de la cellule aux ions Na^+ et K^+ . L'augmentation plus nette que l'on observe au stade 40, liée à une augmentation simultanée du métabolisme oxydatif, serait peut-être à mettre en rapport avec les changements bioélectriques au niveau du mésencéphale en réponse à des stimuli photiques, et décelés à partir du 15^e jour (stade 41) (PETERS et coll., 1956). RUDNICK et WAELSCH (1955) montrent qu'à ce stade la différenciation de l'œil est achevée et qu'il devient fonctionnel. Nous avons vu d'autre

part que ce n'était qu'à ce moment que les contacts synaptiques définitifs étaient établis.

COHN et RICHTER (1956) étudient les rapports existant entre l'activité de la phosphomonoestérase alcaline et celle de l'acétylcholinestérase dans l'hypothalamus et le cortex du Rat. L'augmentation rapide des phosphatases a lieu lors d'une période de croissance caractérisée par une synthèse protéique intense. Cette augmentation de l'activité phosphatasique est antérieure à celle de la cholinestérase. En fait, elle précède toute autre forme de différenciation : apparition des corps de Nissl, augmentation de taille des cellules, acquisition de prolongements cytoplasmiques, augmentation du taux d'activité des systèmes de la succinoxydase et de l'acétylcholinestérase. FLEXNER (1950-1955) constate que son développement est plus précoce que celui de l'ATPase, de la succinodéshydrogénase et de la cytochrome oxydase. CHIRKOVSKAYA (1956) confronte les données concernant l'évolution de l'activité des phosphomonoestérases acide et alcaline dans le système nerveux de l'embryon de Lapin avec des données sur l'incorporation de phosphore radioactif dans l'ADN et dans les phospholipides. Elle constate que les courbes d'évolution de l'activité de la phosphatase alcaline et de la synthèse des phospholipides coïncident et conclut que la phosphatase alcaline serait associée au développement morphologique et fonctionnel du système nerveux.

Les données histochimiques que nous avons obtenues nous permettent de préciser ces points. La phosphatase intervient dans la phase de croissance et de différenciation qui s'étend jusqu'au *stade* 34-35 environ. Au cours de cette période, l'enzyme est localisée dans le cytoplasme et le noyau, et doit jouer un rôle dans le métabolisme des nucléoprotéines. Mais chez l'animal adulte, BOURNE (1958) constate que l'activité de la phosphatase est décelable surtout dans le neuropile. Nous avons observé que ce changement local d'activité débute au *stade* 36 et devient très net à partir du *stade* 40 chez l'embryon de Poulet, bien que la spécificité de l'enzyme n'ait pas été établie. La forte activité de la phosphatase dans les couches plexiformes aux derniers stades du développement, lorsque l'on a décelé une activité bioélectrique, suggère qu'alors l'enzyme pourrait intervenir dans les processus mêmes de la transmission nerveuse.

Ainsi il semble bien prouvé que des corrélations existent entre les différenciations morphologiques biochimiques et fonctionnelles. Ce n'est que lorsque la cellule nerveuse a acquis ses caractères de neurone typique que la différenciation biochimique évolue rapidement en relation avec la différenciation fonctionnelle. Un caractère que jusqu'ici nous avons omis d'aborder nous le prouve. Ce point concerne le parallélisme

existant entre le développement du tissu nerveux et la vascularisation étudiée par FEENEY et WATTERSON (1946). Au cours de la phase du développement des lobes optiques qui s'étend jusqu'aux *stades* 34-35, la pénétration des vaisseaux sanguins dans la paroi des lobes optiques est extrêmement limitée. Il existe un plexus endoneural dans la couche épendymaire, en relation sans doute avec l'activité mitotique de cette couche, d'où partent des capillaires qui rejoignent un plexus périneural. Au *stade* 35, un plexus vasculaire se développe dans la zone des lobes qui présentent la différenciation la plus précoce (couche 4). De nouveaux plexus s'établissent ensuite vers la périphérie, en relation avec la différenciation des strates, et plus particulièrement en relation avec le développement de l'ARN dans les cellules. Il n'est pas nécessaire d'insister sur l'importance que présente le développement de la vascularisation, c'est une cause déterminante dans la différenciation du métabolisme oxydatif, et, par là même, de l'activité fonctionnelle spécifique.

Ce travail contribue à établir qu'il existe bien des liens étroits entre la structure morphologique, la constitution chimique et la fonction. Ainsi que l'écrivent STEINBACH et MOOG (1955) un aspect du métabolisme cellulaire qui est peut-être le plus mystérieux et le plus attrayant concerne le contrôle des réactions chimiques par la substance protoplasmique. C'est là que la cytochimie, la biochimie, la physiologie se rejoignent et s'unissent, puisqu'une partie des mécanismes de contrôle des réactions métaboliques réside dans les éléments figurés du protoplasme.

X. - Conclusions

Ce travail a pour but de mettre en évidence des corrélations éventuelles entre des différenciations morphologiques, biochimiques et fonctionnelles dans les lobes optiques de l'embryon de Poulet. Nous avons été amenés à reconnaître deux périodes dans le développement.

Dans une première période la multiplication cellulaire prédomine ainsi que la migration. Des caractères de différenciation apparaissent qui établissent l'évolution du médulloblaste, cellule indifférenciée du tube neural, en neuroblaste. Ces caractères sont définis par : la présence de neurofibrilles dans le cytoplasme, la formation d'un nucléole ARN positif dans un chromocentre, la concentration de l'ARN cytoplasmique contre la membrane nucléaire.

La phosphatase alcaline se localise dans le noyau au cours des premiers stades ; progressivement elle apparaît dans le cytoplasme dans les derniers stades de différenciation du neuroblaste, en rapport, sans doute, avec la prédifférenciation du neurone.

L'activité d'enzymes spécifiques du métabolisme fonctionnel, l'acétylcholinestérase et le système de la succinoxydase, est très réduite. Pourtant, nous avons pu montrer que ces enzymes étaient déjà présentes dans des médulloblastes (cellules ne possédant pas de neurofibrilles). C'est là un fait essentiel qui prouverait que la différenciation biochimique précède la différenciation morphologique.

La seconde période qui débute au *stade* 36 (10 jours) correspond à la différenciation du neuroblaste en neurone.

Cette différenciation est caractérisée par l'apparition de corps de Nissl dans le cytoplasme, l'augmentation de taille du noyau et du nucléole qui s'enrichit en ARN. Les corrélations entre nos résultats concernant l'ARN et l'azote tissulaire total suggère qu'une synthèse protéique active a lieu. La multiplication cellulaire a cessé, la migration se poursuit, les connexions définitives entre les neurones s'établissent.

L'activité de la phosphatase alcaline augmente nettement, en rapport sans doute avec l'apparition des corps de Nissl. Cette augmentation de l'activité de la phosphatase, sa localisation un peu plus tardive (*stade 40*) dans le neuropile, suggère un rôle possible de l'enzyme dans l'activité fonctionnelle.

C'est au cours de cette période que l'on observe une augmentation rapide de l'activité de l'acétylcholinestérase et du système de la succinoxydase.

Ainsi, il existerait un plan général de différenciation de la cellule nerveuse. Nos résultats sont en accord avec les données d'autres auteurs concernant le développement de la vascularisation d'une part, l'apparition d'une activité bioélectrique dans les lobes optiques d'autre part.

BIBLIOGRAPHIE

- AMANO M., LEBLOND C.P. (1960) — Comparison of the specific activity time curves of ribonucleic acid in chromatin, nucleolus and cyto-Plasm. *Exper. Cell Research*, 20 : 250-253.
- AUGUSTINSSON A. (1950) — Acétylcholine estérase et cholinestérase. In « *The Enzymes* », vol. 1, part 1, Sumner and Myrbäck, Ed. Academic Press, New York. 443-472.
- AUGUSTINSSON A. (1957) — Assay methods for cholinesterases. In « *Methods of Biochemical Analysis* », vol. 5. Interscience Publishers, New York, 1-63.
- BARNER H.D., COHEN S.S. (1956) — Synchronisation of division of a thymonucleic mutant of *Escherischia coli*. *J. Bacteriol.*, 72 : 115-123.
- BELLONCI J. (1888) — Über die centrale Endigung des Nervus opticus bei den Vertebraten. *Zeitschr. f. wiss. Zool.*, 47 : 1-46.
- BERTRAND I. (1930) — *Techniques histologiques de neuropathologie*, 1 vol., Masson, Paris.
- BIETH R., MANDEL P. (1950) — Développement biochimique du cerveau de l'embryon de Poulet. II. Les lipides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 32 : 109-115.
- BOELL E.J., GREENFIELD P., SHEN S.C. (1955) — Development of cholinesterase in the optic lobes of the frog (*Rana Pipiens*). *J. Exp. Zool.*, 129 : 415-452.
- BOIVIN A., VENDRELY R., VENDRELY C. (1948) — Biochimie de l'hérédité. L'acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire, dépositaire de caractères héréditaires ; arguments d'ordre analytique. *Compt. rend.*, 226 : 1061-1063.
- BONICHON A. (1957) — Localisation de l'acétylcholinestérase dans les muscles striés au cours du développement chez l'embryon de Poulet. *Ann. Histochem.*, 2 : 301-309.
- BONICHON A. (1958) — L'acétylcholinestérase dans la cellule et la fibre nerveuse au cours du développement. 1. Différenciation biochimique précoce du neuroblaste. *Ann. Histochem.*, 3 : 85-93.
- BONICHON A. (1960) — Développement de la cholinestérase au niveau du mésencéphale chez l'embryon de Poulet. *J. Neurochem.*, 5 : 195-198.
- BONICHON A., GEREBTZOFF M.A. (1958) — L'acétylcholinestérase dans la cellule et la fibre nerveuse au cours du développement. 2. Relation entre la localisation synaptique de l'enzyme et la myélinisation de la fibre. *Ann. Histochem.*, 3 : 171-178.

- BORSOOK H., DEASY C.L., HAAGEN-SMIT A.J., KEIGHLEY G., LOWY P. (1950) — Metabolism of C¹⁴ labeled glycine, L. histidine, L. leucine, and L. lysine. *J. Biol. Chem.*, 187 : 839-848.
- BOURNE G.H. (1958) — Histochemical demonstration of phosphatases in the central nervous system of the rat. *Exper. Cell Research*, suppl. 5 : 101-117.
- BRACHET J. (1940) — La détection histochimique des acides pentose nucléiques. *C. R. Soc. Biol.*, 133 : 88-90.
- BRACHET J. (1942) — La localisation des acides pentose nucléiques dans les tissus animaux et les œufs d'Amphibiens en voie de développement. *Arch. biol.*, 53 : 207.
- BRACHET J. (1948) — Le rôle et la localisation des acides nucléiques au cours du développement embryonnaire. *C. R. Soc. Biol.*, 142 : 1241-1254.
- BRACHET J. (1952) — *Le rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon*. 1 vol., Desoer., Liège.
- BRACHET J. (1952a) — The role of the nucleus and the cytoplasm in synthesis and morphogenesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 6 : 173-200.
- BRACHET J. (1953) — The use of basic dyes and ribonuclease for cytochemical detection of R.N.A. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 94 : 1-10.
- BRACHET J., JEENER R. (1946) — Phosphatase alcaline des noyaux et vitesse de remplacement du phosphore de l'acide thymonucléique. *C.R. Soc. Biol.*, 140 : 1121-1123.
- BRACHET J., JEENER R. (1948) — Recherches sur le rôle de la phosphatase alcaline des noyaux. *Biochim. Biophys. Acta*, 2 : 423-430.
- BRADFIELD J.R.G. (1947) — Phosphatase cytochemistry in relation to protein secretion. *Exper. Cell Res.*, suppl. 1 : 338-350.
- BRODY T.M., WANG R., BAIN J.A. (1952) — Intracellular distribution of diphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase and cytochrome c reductase in mammalian brain. *J. Biol. Chem.*, 198 : 821-826.
- CASPERSSON T.O. (1941) — Studien über den Eiweissumsatz der Zelle. *Naturwissenschaften*, 29 : 33-43.
- CASPERSSON T.O. (1950) — *Cell growth and cell function*. 1 vol. Norton Ed., New York.
- CASPERSSON T.O., THORELL B. (1941) — Der Endozelluläre Eiweiss- und Nüklein-säurestoffwechsel in embryonalem Gewebe. *Chromosoma*, 2 : 132-154.
- CHEVREMONT M., FIRKET H. (1953) — Alkaline phosphatase of the nucleus. *Intern. Rev. Cytol.*, 3 : 261-288.
- CHIQUOINE A.D. (1954) — Distribution of alkaline phosphomonoesterase in the central nervous system of the mouse embryo. *J. Comp. Neurol.*, 100 : 415-439.
- CHIRKOVSKAYA (1956) — Brain phosphatase in rabbits in ontogenesis (titre en Russe). *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol.* 6 : 19-25.
- COHN P., RICHTER D. (1956) — Enzymatic development and maturation of the hypothalamus. *J. Neurochem.*, 1 : 166-172.

- CONWAY E.J. (1950) — *Microdiffusion analysis and volumetric error*. 1 vol., Crosby Lockwood and Son, London.
- COXON R.V., LIEBECQ C., PETERS R.A. (1949) — The pyruvate oxydase system in brain and the tricarboxylic acid cycle. *Biochem. J.*, 45 : 320-325.
- DANIELLI J.F. (1946) — A critical of techniques for determining the cytological position of alkaline phosphatase. *J. Exp. Biol.*, 22 : 110-117.
- DAVIDSON J.N. (1949) — Nucleoproteins, nucleic acids, and derived substances. *Ann. Rev. Biochem.*, 18 : 155-190.
- DETWILER S. (1946 a) — A quantitative study of locomotion in larval *Amblystoma* following either midbrain or forebrain excision. *J. Exp. Zool.*, 102 : 321-332.
- DETWILER S. (1946 b) — Experiments upon the midbrain of *Amblystoma* embryos. *Am. J. Anat.*, 78 : 115-138.
- DE ROBERTIS E.D.P., BENNETT H.S. (1955) — Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1 : 47-58.
- DE ROBERTIS E.D.P., NOWINSKI W.W., SAEZ F.A. (1960) — *General Cytology*. 1 vol., W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- DOUNCE A.L. (1950) — Cytochemical foundation of enzyme chemistry. In « *The Enzymes* » Sumner and Myrbäck, Ed., vol. 1, part 1, Academic Press, New York, 187-266.
- DOYLE W. (1953) — Quantitative histochemistry of phosphatases. *Intern. Rev. Cytol.*, 2 : 249-260.
- EINARSON L. (1957) — Cytological aspects of nucleic acid metabolism. In « *Metabolism of the Nervous System* ». 1 vol., Pergamon Press, New York, 403-421.
- FEENEY J.F., WATTERSON R.L. (1946) — The development of the vascular pattern within the walls of the central nervous system of the chick embryo. *J. Morphol.*, 78 : 267-271.
- FELDBERG W., VOGT M. (1948) — Acetylcholine synthesis in different regions of the central nervous system. *J. Physiol.*, 107 : 372-381.
- FILOGAMO G. (1960) — Recherches expérimentales sur l'activité des cholinestérases spécifique et non spécifique dans le développement du lobe optique du Poulet. *Ach. Biol.*, 71 : 159-198.
- FIRKET H. (1957) — Recherches sur la synthèse des acides désoxyribonucléiques et la préparation à la mitose dans des cellules cultivées in vitro. (Etudes cytophotométrique et autoradiographique). *Thèse d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur de l'Université de Liège*. H. Vaillant. Carman, Liège.
- FLEXNER L.B. (1950) — The cytological, biochemical, and physiological differentiation of the neuroblast. In « *Genetic Neurology* ». 1 vol. University Chicago Press, 194-198.
- FLEXNER L.B. (1955) — Enzymatic and functional patterns of the developing mammalian brain. In « *Biochemistry of the Developing Nervous System* ». 1 vol., Academic Press, New York, 281-295.

- FLEXNER L.B., FLEXNER J.B. (1946) — Biochemical and physiological differentiation during embryonic development. III. Succinic dehydrogenase and succinoxidase in the cerebral cortex of the fetal pig. *J. Cell Comp. Physiol.*, 27 : 35-42.
- FLEXNER J.B., FLEXNER L.B., STRAUS W.L., Jr. (1941) — The oxygen consumption, cytochrome and cytochrome oxydase activity and histological structure of the developing cerebral cortex of the fetal pig. *J. Cell Comp. Physiol.*, 18 : 355-368.
- FRIEDE R.L. (1958) — Improved technique for histochemical demonstration of succinic dehydrogenase in brain tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 6 : 347-351.
- FRIEDE R.L. (1959) — Histochemical investigation on succinic dehydrogenase in the central nervous system. I. The postnatal development of rat brain. *J. Neurochem.*, 4 : 101-110.
- FRIEDE R.L. (1959) — Transport of oxydative enzymes in nerve fibers ; a histochemical investigation of the regenerative cycle in neurone. *Exptl. Neurol.*, 1 : 441-466.
- GALE E.F. (1953) — Assimilation of amino-acids by gram-positive bacteria and some actions of antibiotics thereon. *Advances in protein Chem.*, 8 : 285-391.
- GALE E.F. (1957) — Nucleic acids and protein synthesis. In « *The Harvey Lectures* », 1955-1956, Serie L, Academic Press, New York, 25-63.
- GASSER H.S. (1952) — The neuron. *Symp. Quant. Biol.*, 17 : 32-36.
- GAYET J. (1955) — Etude comparative entre un aspect de la croissance biochimique et la consommation d'oxygène chez le mésencéphale de l'embryon de Poulet. *Arch. Sc. Physiol.*, 9 : 11-26.
- GAYET J., SCHWANDER J. (1954) — Un aspect de la croissance biochimique du mésencéphale chez l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sc.*, 239 : 624-626.
- GAYET J., BONICHON A. (1961) — Morphological differentiation and metabolism in the optic lobes of the chick embryo. In « *Regional Neurochemistry* », 1 vol., Pergamon Press, Oxford, 135-150.
- GEREBTZOFF M.A. (1953) — Recherches histochimiques sur les acétylcholine et choline estérases. 1. Introduction et technique. *Acta Anat.*, 19 : 366-379.
- GEREBTZOFF M.A. (1955) — Development of cholinesterase activity in the nervous system. In « *Biochemistry of the Developing Nervous System* ». 1 vol., Academic Press, New York, 315-326.
- GEREBTZOFF M.A. (1956) — Recherches sur l'innervation cholinergique comparée du cœur de Mammifère et de Tortue. *Ann. Histochem.*, 1 : 166-175.
- GEREBTZOFF M.A. (1957) — L'appareil cholinestérasique musculo-tendineux : structure, développement, effet de la dénervation et de la ténotomie. *Acta physiol. pharmacol. neerland.*, 6 : 419-427.
- GEREBTZOFF M.A. (1959) — *Cholinesterases*. 1 vol., Pergamon Press, New York.
- GEROLA F.M., VANNINI E. (1948) — L'importanza del pH nella colorazione car verde di metile-pitonina, usata da Brachet per la localizzazione

- istochemica dell' acido ribonucleinico. *Atti Accad. nazion. Lincei*, 5 : 77-81.
- GIACOBINI E. (1959) — The distribution and localisation of cholinesterase in nerve cells. *Acta. Physiol. scand.*, 45 : suppl. 156 : 1-45.
- GOMORI G. (1939) — Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 42 : 23-26.
- GOMORI G. (1951) — Alkaline phosphatase of cell nuclei. *J. Lab. Clin. Med.*, 37 : 526-531.
- GOMORI G. (1952) — *Microscopic Histochemistry. Principles and Practice*. 1 vol., University of Chicago Press, Chicago.
- GREEN D.E., FLEISCHER S. (1960) — Transformation of energy in cellular machines. In « *Enzymes in Health and Diseases* ». 1 vol., Charles C. Thomas, Springfield U.S.A., 51-72.
- HAMBURGER V. (1948) — The mitose patterns in spinal cord of the chick embryo and their relation to histogenetic processes. *J. Comp. Neurol.*, 88 : 221-283.
- HAMBURGER V., LEVI-MONTALCINI R. (1950) — Some aspects of neuroembryology. In « *General Neurology* », 1 vol., University of Chicago Press, 128-160.
- HAMILTON H.L. (1952) — *Lillie's development of the chick. An introduction to embryology*. 1 vol., Willier, New York.
- HIS W. (1889) — Die Neuroblasten und deren Entstehung in embryonalen Mark. *Arch. Anat. Entw.* 1889 : 249-300.
- HIS W. (1904) — *Die Entwicklung des menschlichen Gehirne während der ersten Monate*. 1 vol., Leipzig.
- HOADLEY L. (1924) — The independant differentiation of isolated chick primordia in chorio-allantoic mesencephalon. I. The eye, nasal region, otic region, and mesencephalon. *Biol. Bull.*, 46 : 281-315.
- HOGEBOM G.H., CLAUDE A., HOTCHKISS R.D. (1946) — Distribution of cytochrome oxydase and succinoxidase in cytoplasm of mammalian liver cells. *J. Biol. Chem.*, 165 : 615-629.
- HOLTER H., LINDERSTRÖM-LANG K. (1951) — Micromethods and their application in the study of enzyme distribution in tissues and cells. *Physiol. Rev.*, 31 : 432-448.
- HOTCHKISS R.D. (1955) — The biological role of the deoxyntose nucleic acids. In « *The nucleic Acids* », vol. II. 1 vol., Academic Press, New York, 435-473.
- HUBER G.C., CROSBY E.C. (1929) — The nuclei and fiber paths of the avian diencephalon, with consideration to the telencephalic and certain mesencephalic centers and connections. *J. Comp. Neurol.*, 48 : 1-225.
- HYDEN H. (1942) — Kemiska ornsätningar i den enskilda nervcellen. *Nord. med.*, 13 : 144.
- HYDEN H. (1943) — Protein metabolism in the nerve cell during growth and function. *Acta Physiol. scand.*, suppl. 6 : 1-136.
- HYDEN H. (1955) — Nucleic acids and proteins. In « *Neurochemistry* ». 1 vol., Thomas, Springfield : 204-233.

- KASTEN F.H. (1960) — The chemistry of Schiff's Reagent. *Intern. Rev. Cytol.*, 10 : 1-100.
- KOELLE G.B., FRIEDENWALD J.S. (1949) — A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc Soc. exp. Biol. Med.*, 70 : 617-622.
- KRUGELIS E.J. (1946) — Distribution and properties of intracellular alkaline phosphatase. *Biol. Bull.*, 90 : 220-233.
- KUHLENBECK H. (1936) — Über die Grundbestandteile des Zwischenhirnbauplans der Vögel. *Morphol. Jahrb.*, 77 : 61-109.
- KURNICK N.B. (1950) — The quantitative estimation of desoxyribose-nucleic acid based on methyl-green staining. *Exper. Cell Res.*, 1 : 151-158.
- KURNICK N.B. (1955) — Histochemistry of nucleic acids. *Intern. Rev. Cytol.*, 4 : 221-268.
- LANDSTRÖM H., CASPERSSON T.O., WOHLFART G. (1941) — Über den Nucleotidumsatz der nervenzelle. *Ztschr. f. mikr. anat. Forsch.*, 49 : 534-548.
- LA VELLE A. (1951) — Nucleolar changes and development of Nissl substance in the cerebral cortex of fetal Guinea Pigs. *J. Comp. Neurol.*, 94 : 453-467.
- LA VELLE A. (1956) — Nucleolar and Nissl substance development in nerve cells. *J. Comp. Neurol.*, 104 : 175-206.
- LEGHISSA S. (1958) — Sviluppo e struttura del tetto ottico nel pollo. *Zeith. f. Anat. u. Ent. gesch.*, 120 : 247-273.
- LEHNINGER A.L. (1960) — Energy transformation in the cell. *Scientific American*, 202 : 102-114.
- LESSLER M.A. (1953) — The nature and specificity of the Feulgen Nuclear Reaction. *Intern. Rev. Cytol.*, 2 : 231-247.
- LEVI G. (1925) — Wachstum und Köpersgröße. *Ergebn. d. Anat. u. Entwicklungsgesch.*, 36 : 87-432.
- LISON L. (1953) — *Histochimie et Cytochimie animales. Principes et méthodes*. 1 vol., Gauthier-Villars, Paris.
- LÖVTRUP S. (1953) — Energy source of Amphibian embryogenesis. *Compt. rend. Lab. Carlsberg, sér. Chim.*, 28 : 371-399.
- LÖVTRUP S. (1955) — Chemical differentiation during Amphibian embryogenesis. *Compt. rend. Lab. Carlsberg, sér. Chim.*, 29 : 261-314.
- LOWY R. (1959) — Phosphorylation oxydative. *Biol. Med.*, 48 : 110-158.
- MANDEL P., BIETH R. (1952) — Etude comparée du développement biochimique du cerveau chez quelques espèces de Mammifères. *Comp. rend.*, 235 : 485-487.
- MARRAZZI A.S. (1958) — Study of adrenergic cerebral neurohumors in relation to synaptic transmission mechanisms. *Exper. Cell Res.*, suppl. 5 : 370-385.
- MARUYAMA Y. (1956) — Biochemical aspects of the cell growth of *Escherichia coli* as studied by the method of synchronous culture. *J. Bacteriol.*, 72 : 821-826.

- MERRIAM R.W., KOCH W.E. (1960) — The relative concentration of solids in the nucleolus, nucleus, and cytoplasm of the developing nerve cell of the chick. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, 7 : 151-160.
- MEYERHOF O., GREEN H. (1950) — Synthetic action of phosphatase. II. Transphosphorylation by alkaline phosphatase in the absence of nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 183 : 377-390.
- MICHEL J.P., CHEVREMONT M., FIRKET H. (1956) — Un milieu d'inclusion préservant les substances thermolabiles. Application à l'étude histochimique des enzymes. *Ann. Histochem.*, 1 : 5-11.
- MIRSKY A.E., RIS H. (1951) — The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *J. Gen. Physiol.*, 34 : 451-462.
- MOOG F. (1944) — Localisation of alkaline and acid phosphatases in the early embryogenesis of the chick. *Biol. Bull.*, 86 : 51-81.
- MOOG F. (1946) — The physiological significance of the phosphomonoesterases. *Biol. Rev.*, 21 : 41-59.
- NACHMANSOHN D. (1938) — Cholinestérase dans les tissus embryonnaires. *C. R. Soc. Biol.*, 127 : 670-673.
- NACHMANSOHN D. (1939) — Cholinestérase dans le système nerveux central. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 21 : 761-786.
- NACHMANSOHN D. (1959) — *Chemical and molecular basis of nerve activity*. 1 vol., Academic Press, New York.
- NACHMANSOHN D., MEYERHOF B. (1941) — Relation between electrical changes during nerve activity and concentration of choline esterase. *J. Neurophysiol.*, 4 : 348-361.
- NACHMANSOHN D., MACHADO A.L. (1943) — Formation of acetylcholine. A new enzyme, choline acetylase. *J. Neurophysiol.*, 6 : 396-403.
- OCHOA S. (1941) — « Coupling » of phosphorylation with oxydation of pyruvic acid in brain. *J. Biol. Chem.*, 138 : 751-773.
- O'CONNOR R.J. (1950) — The metabolism of cell division. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 31 : 390-396.
- OVEREND W.G. (1950) — Desoxy-sugars. XIII. Some observations on the Feulgen nuclear reaction. *J. Chem. Soc.*, 2764-2774.
- PALAY S.L. (1956) — Structure and function in the Neuron. In *Progress in Neurobiology I. Neurochemistry*, 1 vol., H. Hoeber. Harper Book, 64-82.
- PALAY S.L. (1956) — Synapses in the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, suppl. 2, 193-202.
- PALAY S.L., PALADE G.E. (1955) — The fine structure of the neurons. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1 : 69-88.
- PALAY S.L., BAIRATI A., MCGEE R. (1959) — The fine structure of axoplasm. *Anat. Rec.*, 133 : 319.
- PEARCE A.G.E. (1954) — *Histochemistry. Theoretical and applied*. 1 vol. J. and A. Churchill, London.

- PEARSON B. (1958) — Improvement in the histochemical localization of succinic dehydrogenase by the use of nitroneotetrazolium chloride. *J. Histochem. Cytochem.*, 6 : 112-121.
- PETERS J.J., VONDERAHE A.R., POWERS T.H. (1956) — The functional chronology in developing chick nervous system. *J. Exper. Zool.*, 133 : 505-518.
- PETERS J.J., VONDERAHE A.R., POWERS T.H. (1958) — Electrical studies of functional development of the eye and optic lobes in the chick embryo. *J. Exper. Zool.*, 139 : 459-468.
- POLLISTER A.W., LEUCHTENBERGER C. (1949) — The nature of the specificity of methyl green for chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 35 : 111-116.
- PONCELET P. (1960) — Convergence de fibres cholinergiques et non cholinergiques sur les cellules pyramidales ammoniques et les grains du fascia dentata. *Acta neurol. psychiatr. belg.*, 60 : 631-673.
- POPE A. (1952) — Quantitative distribution of dipeptidase and acetylcholinesterase in architectonic layers of rat cerebral cortex. *J. Neurophysiol.*, 15 : 115-130.
- POPE A. (1955) — The relationship of neurochemistry to the microscopic anatomy of the nervous system. In « *Biochemistry of the Developing Nervous System* ». 1 vol., Academic Press, New York, 341-349.
- PORTER V.S., DEMING N.P., WRIGHT R.C., SCOTT E.M. (1953). — Effect of freezing on particulate enzymes of rat liver. *J. Biol. Chem.*, 205 : 883-891.
- POTTER V.R. (1948) — The homogenate technique : individual enzyme SDH. In « *Methods in Medical Research* ». vol. 1, 1 vol., Year Book Publishers, Chicago.
- POTTER V.R., SCHNEIDER W.C., LIEBL G.J. (1945) — Enzyme changes during growth and differentiation in the tissues of the new born rat. *Cancer Research*, 5 : 21-24.
- RAMON Y CAJAL S. (1891) — Sur la fine structure du lobe optique des oiseaux et sur l'origine réelle des nerfs optiques. *J. Intern. d'Anat. Physiol.*, 8 : 337-366.
- RAMON Y CAJAL S. (1911) — *Histologie du système nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Vol. 2. A. Maloine ed., Paris, 192-212.
- RAMON Y CAJAL S., DE CASTRO F. (1935) — *Elementos de tecnica micrographica del sistema nervioso*. 1 vol. Tipographia artistica ed., Madrid.
- RAMON Y CAJAL P. (1943) — Lobulos opticos de las Aves. *Trab. Inst. Cajal Invest. biol.*, 35 : 3-20.
- RICHTER D. (1952) — Brain metabolism and cerebral function. In « *Metabolism and function in Nervous Tissue* ». *Biochemical Society Symposia*, 8 : 62-76.
- RICHTER D. (1955) — The metabolism of the developing brain. In *Biochemistry of the developing nervous system*. 1 vol., Academic Press, New York, 225-247.
- RINGLER R.L., SINGER T.P. (1959) — Studies on the mitochondrial α -glycerophosphate. I. Reaction of the dehydrogenase with electron acceptors and the respiratory chain. *J. Biol. Chem.*, 234 : 211-217.

- RIS F. (1899) — Ueber den Bau des lobus opticus der Vögel. *Arch. mikro. anat. und Entwicklgsgesch.*, 53 : 106-130.
- ROBERTSON H.E., BOYER P.D. (1955) — The effect of azide on phosphorylation accompanying electron transport and glycolysis. *J. Biol. Chem.*, 214 : 295-305.
- ROGERS K.T., De VRIES L., KEPLER J.A., KEPLER C.R., SPEIDEL E.R. (1960) — Studies on chick brain of biochemical differentiation related to morphological differentiation and onset of function. II. Alkaline phosphatase and cholinesterase levels, and onset of function. *J. Exper. Zool.*, 144 : 89-103.
- ROMANOFF A.L. (1960) — *The avian embryo. Structural and functional development*. 1 vol. The Macmillan Company, New York.
- RUDNICK D., WAELSCH H. (1955) — Development of glutamo-transferase in the nervous system of the chick. In « *Biochemistry of the Developing Nervous System* ». 1 vol., Academic Press, New York, 335-338.
- RUTHENBURG A.M., WOLMAN M., SELIGMAN A.M. (1953) — Comparative distribution of succinodehydrogenase in six mammals and modification in the histochemical technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 1 : 66-81.
- SAUER F.C. (1935) — Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.*, 62 : 377-405.
- SAUER M.E., CHITTENDEN A.C. (1959) — Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo : evidence for intermitotic migration of nuclei. *Exper. Cell Res.*, 16 : 1-6.
- SAUER M.E., WALKER B.E. (1959) — Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 101 : 557-560.
- SAWYER C.H. (1943) — Cholinesterase and the behavior problem in *Amblystoma*. III. The distribution of cholinesterase in nerve and muscle through development. IV. Cholinesterase in nerveless muscle. *J. Exper. Zool.*, 94 : 1-28.
- SAWYER C.H. (1955) — Further experiments on cholinesterase and reflex activity in *Ambystoma* larvae. *J. Exper. Zool.*, 129 : 561-578.
- SCHNEIDER W.C. (1959) — Mitochondrial metabolism. In *Advances in Enzymology*, 21 : 1-72.
- SHEN S.C., GREENFIELD P., BOELL E.J. (1955) — The distribution of cholinesterase in the frog brain. *J. Comp. Neurol.*, 102 : 717-744.
- SHEN S.C., GREENFIELD P., BOELL E.J. (1956) — Localization of acetylcholinesterase in chick retina during histogenesis. *J. Comp. Neurol.*, 106 : 433-452.
- SHIMIZU N., MORIKAWA N. (1957) — Histochemical studies of succinic dehydrogenase of the brain of Mice, Rats, Guinea pig and Rabbits. *J. Histochem. Cytochem.*, 5 : 334-345.
- SIDMAN R.L., MIALE J.L., FEDER N. (1959) — Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone ; an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp. Neurol.*, 1 : 322-333.
- SINDEN J.A., SCHARRER E. (1949) — Distribution of certain enzymes in the brain of the pigeon. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 72 : 60-62.

- SLATER E.C. (1958) — The constitution of the respiratory chain in animal tissues. In *Advances in Enzymology*, 20 : 147-200.
- STEINBACH H.B., MOOG F. (1955) — Cellular metabolism. In *Analysis of Development*, 1 vol., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 70-90.
- STIEDA L. (1868) — Studien über das centrale Nerven system der Vögel und Säugehiere. *Zeitschr. f. wiss. Zool.*, 19 : 1-94.
- SWIFT H. (1953) — Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Intern. Rev. Cytol.*, 2 : 1-77.
- TAKAMATSU H. (1939) — Histologische und biochemische Studien über die phosphatase. I. Mitteilung Histochemische Untersuchungsmethodik der phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben. *Tr. Soc. Path. Jap.*, 29 : 492-498.
- TELLO F. (1923) — Les différenciations neuronales dans l'embryon du Poulet pendant les premiers jours de l'incubation. *Trav. Lab. Rech. Biol. Univ. Madrid*, 21 : 1-93.
- TEWARI H.B., BOURNE G.H. (1962) — Histochemical evidence of metabolic cycles in spinal ganglion cells of Rat. *J. Histochem. Cytochem.*, 10 : 42-64.
- TYLER A. (1942) — Developmental processes and energetics. *Quart. Rev. Biol.*, 17 : 197-212, 339-353.
- VAN GEHUCHTEN A. (1892) — La structure des lobes optiques chez l'embryon de Poulet. *La cellule*, 8 : 743.
- VERCAUTEREN R. (1950) — Sur l'emploi de la ribo- et de la désoxyribonucléase. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 32 : 473-475.
- VERCAUTEREN R. (1950) — The structure of deoxyribose nucleic acid in relation to cytochemical significance of the methyl-green pyronin staining. *Enzymologia*, 14 : 136-140.
- WATSON M.L. (1954) — Pores in the mammalian nuclear membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 15 : 475-479.
- WATSON M.L. (1955) — The nuclear envelope. Its structure and relation to cytoplasmic membrane. *J. Biophys. biochem. cytol.*, 1 : 257-270.
- WEISS P. (1955) — Nervous system — (Neurogenesis) — In *Analysis of Development*, 1 vol., W.B. Saunders, Philadelphia, 346-401.
- WOLFF E., HAFFEN K. (1952) — Sur le développement et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'oiseau en culture *in vitro*. *J. Exper. Zool.*, 119 : 381-399.
- YOUNGSTROM K.A. (1938) — On the relationship between choline esterase and the development of behavior in Amphibia. *J. Neurophysiol.*, 1 : 357-363.
- ZACKS S.I. (1954) — Esterases in the early chick embryo. *Anat. Record*, 118 : 509-537.
- ZEUTHEN E. (1951) — Segmentation, nuclear growth and cytoplasmic storage in eggs of echinoderms and amphibians. *Pubbl. straz. zool. Napoli*, 23 : 47-69.
- ZEUTHEN E., SCHERBAUM O. (1954) — Induction of synchronous cell division in mass culture of *Tetrahymena piriformis*. *Exp. Cell. Res.*, 6 : 221-227.

TABLE DES MATIERES

I. — Introduction	1
II. — Matériel et méthodes	11
III. — Description succincte des stades du développement embryonnaire et de la différenciation neurofibrillaire ..	25
A. — Le développement du mésencéphale de l'embryon de Poulet	25
B. — Les neurofibrilles	33
1°) Résultats	33
2°) Discussion	38
IV. — L'azote total tissulaire	41
1°) Résultats biochimiques	41
2°) Discussion	41
V. — Les acides nucléiques	47
1°) Résultats histochimiques	47
2°) Discussion	52
VI. — La phosphomonoestérase alcaline	57
1°) Résultats histochimiques	57
2°) Discussion	63
VII. — La succinodéshydrogénase et la succinoxydase	67
1°) Résultats histochimiques	67
2°) Résultats biochimiques	70
3°) Discussion	74
VIII. — Les cholinestérases	77
1°) Résultats histochimiques	77
2°) Résultats biochimiques	81
3°) Discussion	85
IX. — Discussion générale	89
X. — Conclusions	95
XI. — Bibliographie	97