IMPORTANCE DES DIFFÉRENTES PÉRIODES OVOGÉNÉTIQUES DANS LA GONADE FEMELLE D'EMBRYON DE BREBIS ; CONTRÔLE DU CHANGEMENT DE COMPORTEMENT MITOTIQUE EN MÉIOTIQUE

P. MAULÉON

avec la collaboration technique de Françoise BERTHELOT et Jacqueline BEZARD

*Station de Physiologie de la Reproduction,
Centre de Recherche de Tours, I. N. R. A.,
Nouzilly, 37380 Monnaie*

RÉSUMÉ

Les cellules germinales de la gonade d'embryon de brebis qui commencent leur méiose au début, au milieu, ou à la fin de la période ovogénétique (52-82^e jours) peuvent participer à la constitution de la réserve ovocytaire trouvée dans l'ovaire de 100 jours : injectée à chacun des jours de cette période, la thymidine tritiée s'incorporant pendant la synthèse préméiotique marque fortement des ovocytes qui débutaient alors leur méiose. La proportion variable d'ovocytes provenant de chacun de ces jours est maxima pour les périodes 54-56^e jours et 62-64^e jours ; cette proportion dépend :

1) des nombres de cellules qui vont se trouver en synthèse préméiotique chaque jour, c'est-à-dire du schéma de multiplication des ovogonies. La forme de la courbe du pourcentage d'ovocytes marqués et les variations de fréquence des ovocytes très marqués (index de marquage > 4) en fonction des jours d'injection s'expliquent par un renouvellement des générations de multiplications ovogoniales ;

2) de l'intensité des phénomènes de dégénérescence qui détruisent la majeure partie des ovocytes provenant des générations de multiplications débutant après le 66^e jour.

Au cours de la période de préméiose, il existe une phase critique (47-50 jours chez l'embryon de brebis) après laquelle le déroulement de la méiose *in vitro* se fait normalement mais avant laquelle les modifications créées par la mise en culture suppriment l'apparition des figures méiotiques. Les cellules germinales qui séjournent *in vitro* gardent la potentialité de reprendre l'enchaînement des processus qui induisent la méiose (greffes d'ovaires cultivés 10 jours chez des embryons hôtes). Ces résultats et ceux des travaux récents sur ce sujet sont discutés en face des hypothèses d'environnements local ou général favorables à l'induction de la méiose et d'échanges entre cellules germinales et cellules somatiques.

Chez les femelles de Mammifères, au cours de la vie prépubère puis adulte, une réserve limitée de gamètes est régulièrement gaspillée. Le nombre d'ovocytes qui constituent cette réserve est très variable. Leur formation dépend des facteurs qui contrôlent le début de la méiose et son arrêt au stade diplotène. La période de production de ces ovocytes, ou ovogénèse, a une durée variable suivant les espèces ; elle se termine chez l'embryon de brebis au 100^e jour de la gestation (MAULÉON, 1961 *a*, 1967 *a* - 1967 *b*). Le changement de comportement mitotique en comportement méiotique est observable chez des ovogonies entre le 52^e et le 100^e jour. Toutefois, beaucoup de ces cellules germinales débutant cette différenciation sont détruites lorsque s'opère le blocage de la méiose au stade diplotène. Existe-t-il une participation égale de chaque période où débute la méiose à la constitution de la réserve d'ovocytes au stade diplotène ? L'entrée en méiose des cellules germinales de la gonade femelle embryonnaire ou post-natale est-elle un phénomène « décidé » parce que transcrit dans la cellule elle-même ; cette décision est-elle modifiable ou annulable ?

Ce sont ces deux aspects qui ont fait l'objet de ce travail utilisant la technique de marquage cellulaire et celle de culture organotypique.

I. — PARTICIPATION DE CHAQUE PÉRIODE DE L'OVOGÉNÈSE (42-82^e JOUR DE LA VIE EMBRYONNAIRE)

A LA CONSTITUTION DE LA RÉSERVE OVOCYTAIRE DE LA BREBIS

Les ovocytes formés chez l'embryon sont les mêmes que ceux trouvés chez l'animal prépubère ou adulte (souris : RUDKIN et GRIECH, 1961 et 1962). Le marquage du noyau des cellules germinales avec la thymidine tritiée pendant les synthèses mitotique et préméiotique d'ADN a permis de le montrer.

Matériel et méthodes

En faisant varier le jour d'injection de la thymidine tritiée, pendant la période ovogénétique, une image « instantanée » de la population des cellules germinales se multipliant ou débutant leur méiose est fournie par l'étude du marquage autoradiographique des cellules un temps court (2 heures) après l'injection. Les variations du pourcentage d'ovocytes marqués et de l'intensité du marquage de ces cellules à la fin de l'ovogénèse (100 jours) révèlent la part relative jouée par chaque période de l'ovogénèse dans la constitution de la réserve ovocytaire.

Les conditions d'injection de la thymidine tritiée aux embryons, de leur prélèvement (2 heures post injection et à l'âge de 100 jours), de réalisation technique des autoradiographies et aussi d'analyse quantitative du marquage des cellules germinales ont été précisées dans une publication antérieure (MAULÉON, 1974). Un soin particulier a été apporté au choix des coupes ou des portions de coupes d'ovaires analysées. L'échantillonnage « raisonné » utilisé a tenu compte pour le choix des coupes de l'hétérogénéité entre coupes de la structure ovarienne : les comptages n'ont eu lieu que sur des coupes comportant à la fois cortex et médulla. Lorsqu'une partie seulement des cellules germinales a fait l'objet de mesure (intensité de marquage) ou d'identification (gonies, ou stades de la prophase méiotique), pour le choix des portions de coupes analysées on a considéré la localisation particulière de chaque type cellulaire : un découpage de zones radiales a été fait sur deux diamètres perpendiculaires. Les corrections de marquage dues au bruit de fond ont été faites à partir de valeurs individuelles déterminées au-dessus du cytoplasme proche du noyau où était effectuée la mesure d'intensité. Cette mesure, exprimée en quantité de lumière réfléchie par les grains d'argent de l'autoradiographie MPV Leitz), est rapportée à l'unité de

surface du noyau et donne l'index de marquage $I_M = \frac{I_{MPV} - I_{BF}}{S_N}$. Dans la détermination des pourcentages moyens de cellules marquées, la valeur moyenne du bruit de fond a été considérée comme égale à 3 ou 4 grains par noyau et la classification d'un ovocyte en marqué ou non marqué a été faite par observation du nombre de grains au-dessus de son noyau.

Résultats

L'image « instantanée » de la fréquence des cellules germinales qui vont se diviser ou débiter leur méiose est révélée par le taux d'ovogonies et d'ovocytes au stade préleptotène marqué deux heures après l'administration de thymidine tritiée. Après cette injection, 30 p. 100 des ovogonies et 32,6 p. 100 des stades préleptotène-leptotène sont identifiés « marqués ». Les variations de ces deux paramètres sont respectivement de 25 à 35,5 p. 100 et de 26,6 à 34,2 p. 100 selon l'âge de l'embryon le jour de l'injection. Dans le cas des ovogonies, il y a 34,4 p. 100 des cellules germinales marquées lorsque l'injection est faite avant le 64^e jour de gestation et 26,3 p. 100 si elle est faite après. Cette différence est significative. Il n'y a qu'une très faible variation selon ces deux périodes de l'ovogénèse dans le taux de préleptotènes marqués (moins de 4 p. 100).

Lorsque le prélèvement est effectué à la fin de l'ovogénèse (100 jours), le taux d'ovocytes marqués est mesuré un temps variable après l'incorporation de thymidine tritiée, mais ce temps est toujours supérieur à 12 jours, c'est-à-dire à la durée de la méiose du stade préleptotène au stade diplotène. Dans ces conditions, par suite de la dilution du marquage au cours des divisions, seuls seront « identifiés marqués » les ovocytes qui ont incorporé la thymidine tritiée dans leur ADN au cours de la synthèse préméiotique ou au cours d'une synthèse mitotique qui n'a pas été suivie de plus de deux (ou trois) divisions.

La courbe de fréquence du pourcentage d'ovocytes marqués (P_{100}) à un âge donné est donc l'image transposée dans le temps de la fréquence des cellules germinales passant d'un comportement mitotique à un comportement méiotique ou étant sur le point de le faire, ce que nous conviendrons d'appeler avec CHALLONER (1975) en préméiose. Or, nous avons vu qu'en première approximation, environ le 1/3 de toutes les cellules se trouvant dans cette situation incorpore le radio-élément quel que soit le jour de l'injection. S'il existe de fortes variations de P_{100} en fonction de ce jour, elles seront donc le reflet des variations numériques des cellules germinales en préméiose. Cette image transposée est toutefois modifiée par les phénomènes de dégénérescence au moment de l'arrêt au stade diplotène. Ces phénomènes sont intenses à partir du 65^e jour d'âge. De nombreux ovocytes marqués et non marqués disparaissent alors selon une règle que nous ne connaissons pas.

1. Phases de la période ovogénétique participant à la constitution de la réserve ovocytaire.

En dépit de la complexité du critère P_{100} qui est la résultante de plusieurs phénomènes (rythmes des divisions ovogoniales, asynchronisme des évolutions, renouvellement des générations de multiplication, disparition des cellules), la forme de la courbe de fréquence de ce pourcentage d'ovocytes (P_{100}) permet de répondre à cette question.

Une forte proportion de la réserve ovocytaire provient de la période ovogéné-

tique située entre le 52^e et le 64^e jour, puisque, si l'injection est faite un de ces jours-là, de 45 à 70 p. 100 des ovocytes sont identifiés marqués dans l'ovaire de 100 jours.

Les ovocytes qui sont les premiers à entrer en méiose à 52-54 jours se retrouvent comme éléments constituant le stock de gamètes aussi bien que ceux qui débutent leur méiose le 72^e jour ; mais ils seront peu nombreux.

TABLEAU I

Fréquence (en p. 100) par classes d'index de marquage des noyaux des ovocytes selon l'âge de l'embryon de brebis le jour d'injection de la thymidine tritiée

Age de l'embryon	Classes d'index de marquage (1) (échelle logarithmique)				
	0,25-0,5	0,5-0,1	1,0-2,0	2,0-4,0	> 4,0
49	70,4	24,3	5,2	—	—
52	14,9	45,4	30,6	9,1	0
54	38,9	37,9	16,7	5,1	1,4
56	24,8	37,4	25,2	8,4	4,2
60	39,8	39,4	14,5	4,6	1,7
62	28,4	37,7	23,3	5,5	3,8
64	25,2	32,9	23,4	12,3	6,1
68	40,7	25,6	16,3	15,1	2,3
72	18,6	26,1	28,9	9,6	5,4
75	55,6	27,1	15,0	1,5	0,7
82	37,3	43,4	14,5	3,5	0

(1) Index de marquage $\frac{I_{MPV} - I_{BG}}{S_N}$. Ovaires fixés à 100 jours.

Si l'on considère les ovocytes fortement marqués (index de marquage supérieur à 4, tabl. 1), une conclusion identique peut être tirée : du début à la fin de la période ovogénétique les ovocytes néoformés participent à la constitution de la réserve ovocytaire. Ces ovocytes fortement marqués ($I_M > 4$), c'est-à-dire ceux dont l'injection de thymidine tritiée a révélé la synthèse préméiotique, sont localisés près de la médulla dans l'ovaire de 100 jours lorsque l'injection est faite le 52-56^e jour, au milieu du cortex pour le 64^e et très superficiellement après administration le 72^e jour. Dans la couronne corticale ovarienne qu'ils peuplent, les ovocytes à cet âge peuvent être datés par la localisation topographique. Ce fait est clair chez la brebis car les séquences de leur formation s'étalent sur un temps assez long (Pl. I).

Il existe bien une période ovogénétique qui contribue plus que les autres à l'établissement de la réserve, comme le suggéraient BLACK et ERICKSON (1968) chez le porc. Toutefois, elle reste large et l'avantage d'avoir étudié chaque jour de cette période et non pas quelques points espacés (BLACK et ERICKSON, 1968) est de faire apparaître que chez la brebis l'ovogenèse est un processus qui doit être entretenu pour être capable de durer un temps aussi long.

2. *Existence d'au moins deux générations de multiplications ovogoniales chez l'embryon de brebis.*

La courbe de fréquence du pourcentage d'ovocytes marqués (P_{100}) ne présente pas un plateau entre les jours d'injection 52 et 64, mais une chute marquée vers le 60^e jour. La valeur P_{100} pour l'injection à 60 jours ($46,8 \text{ p. } 100 \pm 3,6$) est significativement différente des deux maxima, 64,8 et 68,2, qui l'encadrent pour des injections à J_{54-56} ou J_{62-64} . Un plus faible pourcentage d'ovocytes très marqués ($I_M > 4$ ou $I_M > 2$) est trouvé dans l'ovaire de 100 jours si l'injection est faite à J_{60} au lieu de J_{56} et J_{64} (respectivement 1,7 p. 100 et 6,5 p. 100 *vs* ; 4,2 p. 100 et 12,6 p. 100 ; 6,1 p. 100 et 18,4 p. 100).

Cette période centrée à J_{60} est donc encadrée, d'après ces résultats, par deux moments où de plus grands nombres de cellules germinales sont en « préméiose ». C'est ce que nous avons confirmé expérimentalement, en déterminant dans les ovaires de ces différents âges (J_{60} , J_{56} , J_{64}) deux heures après l'injection la fréquence des stades préleptotènes rapportées au nombre total de cellules germinales (14 p. 100 *vs*, 23 et 24 p. 100).

Il est donc logique de penser que les deux paramètres P_{100} et $I_M > 4$ sont plus faibles lorsqu'une injection a lieu à J_{60} parce que l'on trouve pour une forte proportion de cellules germinales une dilution du marquage identique à celle observée avant le 52^e jour.

L'hypothèse qu'une nouvelle génération de multiplications ovogoniales à partir de gonies souches a commencé vers le 60^e jour peut-être émise. La plus grande fréquence des ovogonies dans l'ovaire de 62 à 64 jours (79,4 et 62,3 p. 100) succédant à une diminution régulière de ce pourcentage du 52-56^e au 60^e jour (98 p. 100-76,5 p. 100 ; 54,5 p. 100) appuie cette hypothèse.

Les ovogonies débutant ou approchant du début de la méiose dans l'ovaire de 72 jours se retrouvent peu nombreuses dans l'ovaire de 100 jours. Pourtant, les ovogonies presque absentes à 66-68 jours (23,5 p. 100 et 26,4 p. 100 des cellules germinales) redeviennent proportionnellement plus nombreuses que les autres types cellulaires, certes frappés par les phénomènes de dégénérescence à J_{72} et J_{75} (68,4 et 55,9 p. 100). Le pourcentage des ovocytes fortement marqués ($I_M > 4$) et ($I_M > 2$) après injection de thymidine à J_{72} est aussi plus élevé qu'après des injections à J_{68} et J_{75} (tabl. 1). Une nouvelle génération de cellules germinales a débuté une série de multiplications vers 66 jours mais l'intensité de la dégénérescence l'a rendue inefficace pour la constitution du stock d'ovocytes.

Discussion

La comparaison de la courbe de fréquence des pourcentages d'ovocytes marqués (fig. 1) avec celle obtenue chez la ratte en suivant une méthodologie d'étude identique (MAULÉON, 1967 *a* et *b*) illustre l'hypothèse qu'il existe chez l'embryon de brebis au moins deux générations de multiplications ovogoniales identiques à celle mise en évidence chez la ratte. Ces générations se succèdent mais s'enchevêtrent par suite de l'asynchronisme d'évolution des cellules germinales appartenant à une même génération.

De même, l'hétérogénéité de générations auxquelles appartiennent les cellules germinales qui incorporent la thymidine tritiée au moment de l'injection ressort également de la comparaison des distributions des fréquences d'intensité de marquage à un âge donné (comparaisons faites après transformation de LAZAR et GERARD-MARCHAND, 1962). Lorsqu'il y a seulement asynchronisme d'évolutions entre cellules, la courbe des fréquences cumulées (échelle probit-log.) est une droite (cas de la ratte) (MAULÉON, 1967 *a* et *b*). S'il existe plusieurs générations cellulaires décalées dans leur évolution, cette courbe est une ligne brisée (MAULÉON, 1974).

FIG. 1. — Variations des pourcentages d'ovocytes marqués

— dans l'ovaire d'embryon de brebis de 100 jours,

□ index de marquage < 0,25 au MPV

● — si plus de 4 grains

○ — si plus de 3 grains

— dans l'ovaire de rat de 20 jours après la naissance,

● — si plus de 10 grains

en fonction du jour d'injection du marqueur radioactif (thymidine tritiée).

La forme de la courbe de fréquence des mitoses goniales bloquées pendant 3 heures par la colchicine ne pouvait aussi s'expliquer qu'en faisant la même hypothèse (MAULÉON, 1961 *b*).

II. — EXISTENCE D'UN CONTRÔLE DU DÉBUT DE LA MÉIOSE DANS LES OVOGONIES D'OVAIRES D'EMBRYON DE BREBIS

L'entrée des cellules germinales femelles en méiose est un événement « décidé » par leur constitution génétique et que rien ne vient perturber. Cette opinion souvent exprimée s'appuie sur le fait que « le processus entier de l'ovogénèse peut avoir lieu *in vitro* dans des conditions de culture appropriées » (MARTINOVITCH, 1938). Elle est confirmée par les résultats obtenus avec des chimères expérimentales XX/XV de souris (MYSTOWSKA et TARKOWSKI, 1970 ; McLAREN *et al.*, 1972) : les cellules germinales qui entrent en méiose dans la gonade avant la naissance sont des cellules XX.

Nous avons essayé de voir si des modifications expérimentales de l'environnement des cellules germinales au cours de leur mise en culture *in vitro* ne pouvaient pas empêcher le changement de comportement mitotique en méiotique de s'opérer dans les gamètes femelles. Nous ne nous sommes donc intéressés qu'au début de la méiose, c'est-à-dire à sa première phase, les autres phases (formation du complexe synaptinémal, évolution au-delà de ce stade, arrêt du mécanisme de la prophase méiotique) pouvant dépendre de contrôles différents.

Matériel et méthodes

Les techniques de culture organotypique sont celles précisées précédemment (MAULÉON, 1973). Dans les cultures immergées, les gonades reposent sur un fond gélosé (1 p. 100 dans solution de Earle), le milieu de culture étant de même composition que celui utilisé pour les cultures sur grille. La technique de greffe des ovaires cultivés *in vitro* chez les embryons hôtes n'a reçu que des modifications mineures du système de fixation du greffon par rapport à celle de MAULÉON (1973). L'analyse cytologique des stades la prophase méiotique a été faite par la méthode de LUCIANI *et al.* (1974).

Résultats

1. *Influence de l'âge de l'embryon au moment du prélèvement de l'ovaire pour sa mise en culture sur le déroulement de la méiose.*

Le changement de comportement mitotique en comportement méiotique ne se produit pas en culture organotypique lorsque la gonade est prélevée avant le 50^e jour de la vie embryonnaire. Les premières figures de début de la méiose apparaissent normalement au 52^e jour *in vivo* (sur moins de 2 p. 100 des cellules germinales).

L'évolution de la prophase méiotique du stade leptotène au stade diplotène se poursuit dans les cultures organotypiques réalisées dans les mêmes conditions techniques lorsque l'ovaire d'embryon de brebis est prélevé après le 50^e jour de la vie. Toutefois, l'étude quantitative des proportions de stades de début de méiose (leptotène + zygotène) par rapport aux stades de fin de méiose (pachytène + diplotène) montre qu'un faible nombre d'ovogonies entre en méiose après la mise en culture.

Comme nous l'avons déjà discuté précédemment (MAULÉON, 1973), ces résultats n'étaient pas en contradiction avec la plupart des observations des auteurs ayant publié auparavant puisque presque tous avaient mis en culture des ovaires présentant déjà les premières figures de méiose (tabl. 2).

TABLEAU 2

*Age des embryons au moment de l'explantation de la gonade
pour sa mise en culture.
Classement des prélèvements selon les résultats du déroulement de la méiose in vitro*

Espèce	Age de l'embryon au moment de la mise en culture (jours)	Déroulement de la méiose <i>in vitro</i>	Auteurs
<i>Souris</i> (13 j)	12-13 16 13-18	Normal	WOLFF (1952) BLANDAU <i>et al.</i> (1965) ODOR et BLANDAU (1971) BORGHESE et VENINI (1956)
<i>Rat</i> (16,5-17 j)	15-16 2 j p.n.		MARTINOVITCH (1936) BOUSQUET (1967)
<i>Hamster</i> (1 j p.n.)	15		CHALLONER (1975)
<i>Brebis</i> (52 j)	55		MAULÉON (1973)
<i>Homme</i> (8 sem.)	9-28 sem. 22 mm-171 mm		BAKER et NEAL, (1974) BLANDAU (1969)
<i>Poulet</i> (16 j)	8-10-12	jusqu'à lepto-zygo	ERICKSON (1974)
<i>Poulet</i> (16 j)	4-6	Absence	ERICKSON (1974)
<i>Brebis</i> (52 j)	47-50		MAULÉON (1973)
<i>Hamster</i> (1 j p.n.)	13-14		CHALLONER (1975)
<i>Souris</i> (13 j)	11		WOLFF (1952)

() Age de l'embryon au moment de l'apparition des premières figures de prophase méiotique pour chaque espèce.

Les observations de SALZGEBER (1962) et d'OGAWA (1968) à la suite de mise en culture de très jeunes ovaires de souris pourraient être une confirmation des résultats que nous obtenons. Les mauvaises conditions de prélèvement des gonades indifférenciées et de petite taille peuvent être jugées responsables de l'absence de figure de méiose dans les gonades en culture ; cette hypothèse a d'ailleurs été formulée par ERICKSON (1974) observant ces mêmes résultats après prélèvement de gonades d'embryon de poulet avant le 8^e jour.

Deux précisions doivent être apportées aux conclusions telles que nous avons pu les résumer ci-dessus :

a) Le pourcentage de cellules en début de méiose (formes anormales citées par MAULÉON, 1973, ou leptotène-zygotène d'ERICKSON, 1974) augmente lorsque l'âge de prélèvement s'approche de celui auquel apparaissent normalement les premières figures de méiose.

Le pourcentage de cellules en début de prophase méiotique par rapport aux cellules germinales présentes dans l'ovaire double lorsque la gonade analysée à un même âge de 58-60 jours est prélevée à 50-52 jours au lieu de 47-49 jours (MAULÉON, 1973). De même, dans les gonades d'embryon de poulet mises en culture à 8 jours, il y a de 2 à 60 p. 100 de cellules en début de méiose à 17 jours, mais de 87 à 96 p. 100 si ces gonades le sont à 12 jours (ERICKSON, 1974).

b) Dans les figures de début de méiose présentées dans les publications, lorsque l'âge de prélèvement est proche bien qu'antérieur à celui de l'âge normal d'apparition des premiers leptotènes, l'appariement des filaments chromosomiques n'a jamais été noté. L'examen histologique de ce point de vue est nettement insuffisant et seule une étude cytologique permet de l'affirmer (Pl. II et III).

Nous avons parlé (MAULÉON, 1973) ainsi que CHALLONER (1975), de formes anormales. Ces formes (leptotènes « en boule ») sont également rencontrées à la fin de la période ovogénétique normale (80 jours), période pendant laquelle beaucoup des cellules en début de méiose ne vont pas évoluer. Il nous a semblé aussi, comme cet auteur, observer histologiquement des stades zygotène que nous n'avons pas retrouvés au cours des études cytologiques. Nous ne pensons pas également que les figures cytologiques interprétées comme zygotène dans le travail d'ERICKSON (1974) montrent d'appariements chromosomiques.

2. *L'état des cellules germinales après 10 jours de culture est tel qu'il est possible de faire réapparaître la méiose dans ces cellules.*

Les conditions de survie *in vitro* sont souvent considérées comme défavorables. Pourtant, le déroulement de la méiose *in vitro*, lorsqu'elle a débuté, se fait de façon identique à celui réalisé *in vivo*. Dans l'ovaire humain, la durée des stades de la méiose est la même : leptotène, 2 jours ; zygotène, 10 jours ; pachytène, 20 jours (BAKER et NEAL, 1974).

De plus, les résultats que nous avons obtenus ne dépendent pas des méthodes de culture et sont identiques après culture sur grille ou culture immergée selon une technique voisine de celle d'ERICKSON (1974). Chez le hamster, si les ovaires sont explantés avant le 15^e jour p. c., la prophase méiotique ne commence pas après une culture de la gonade par une méthode identique à celle de BAKER et NEAL (1969), donc très différente de la nôtre par son milieu, les proportions de CO₂ et la pression du gaz environnant (CHALLONER, 1975).

Les conditions de culture *in vitro* ne sont sans doute pas trop déprimantes pour les cellules germinales puisqu'une reprise de la méiose a été observée dans les ovaires d'embryons de brebis mis en culture depuis 10 jours après greffes chez des embryons hôtes (MAULÉON, 1973).

Deux remarques doivent être faites sur ces résultats de greffe. Elles orientent les hypothèses que l'on peut faire sur l'absence d'apparition de la méiose *in vitro* dans les ovaires explantés à un âge « critique » :

a) La reprise de la méiose après greffe n'a été observée que dans un nombre limité de cas très précis dépendant de l'âge de l'embryon hôte (tabl. 3) ; la survie même des cellules germinales indépendamment de la reprise de la méiose est toujours meilleure chez des embryons jeunes. Les greffons ont été placés après castration de l'embryon dans cette même localisation gonadique. Chaque fois qu'un fragment

d'ovaire de l'embryon hôte a été oublié ou laissé volontairement son identification a toujours été facile et aucune confusion n'est possible entre un tel fragment et le greffon de l'ovaire provenant de la culture *in vitro*.

TABLEAU 3

Résultats des greffes d'ovaires d'embryons de brebis cultivés in vitro pendant 9-10 jours chez des embryons hôtes de la même espèce

Age		Nbre ovaires	Résultats											
Ovaire mis en culture	Embryon hôte		Embryons morts	Greffons non retrouvés	Pas de cellules germinales	Embryons vivants								
						Greffons retrouvés								
						Présence de cellules germinales								
						Absence de méiose			Présence de méiose					
Durée de séjour chez l'hôte														
6 10 13			12 14 21											
37 j	56-58 j	3	0/3	0/3	0/3	3								
47-49 j	{ 56-58 j 120 j	19	2/19	3/17	0/14	4	5	1	1	2	1			
		10	2/10	2/8	5/6	1								

Une première hypothèse est que cette reprise résulte d'un environnement hormonal favorable lié à l'âge de l'embryon hôte. Elle est en contradiction avec les résultats négatifs obtenus par addition d'hormones sous diverses formes au milieu de culture (MAULÉON, 1973 ; CHALLONER, 1975). Toutefois, toutes les hormones n'ont pas été essayées et la réalisation d'un équilibre hormonal optimum est toujours aléatoire *in vitro*.

Une deuxième hypothèse, celle de l'existence d'une substance diffusible émise localement par la gonade (ou un autre organe) de l'embryon hôte pourrait être faite après l'observation que les résultats positifs sont obtenus dans des gonades greffées près du mesonephros. Cette hypothèse a d'ailleurs été faite par ERICKSON (1974) cultivant des cellules isolées avec des fragments de cortex. Toutefois, les cultures associées d'ovaires d'embryons de brebis prélevés avant et après le 50^e jour montrent une évolution indépendante et caractéristique des gonades explantées à deux âges différents (Pl. IV).

b) Un temps de séjour de 12 jours chez l'hôte est nécessaire pour que la méiose soit observée dans le greffon ; il faut admettre qu'il existe dans l'ovaire « cultivé » des ovogonies capables d'entrer en méiose et que la greffe permet non pas une simple levée d'inhibition d'un phénomène, mais la mise en place d'un enchaînement de processus.

Discussion

Des résultats précédents, il apparaît :

1. *Un moment critique avant lequel les ovogonies sont incapables d'entrer en méiose in vitro.*

Entre 47-49 jours chez l'embryon de brebis (MAULÉON, 1973), 14-15 jours chez le Hamster (CHALLONER, 1975), 11-12 jours chez la Souris (d'après les remarques de WOLFF, 1952, et SALZGEBER, 1962) et sans doute 13-14 jours chez le Rat.

Cet état mal défini actuellement ne se situe pas immédiatement avant la dernière synthèse préméiotique d'ADN mais plutôt pendant une « préméiose » où les cellules ont encore un comportement mitotique.

2. *Un environnement local favorable* doit être nécessaire à un apport (actuellement hypothétique) de substances « trophiques » nécessaire à l'induction de la méiose.

Récemment, BYSKOV (1974) a montré le rôle possible des cellules somatiques du rete ovarii dans une telle induction en supprimant leur présence avant la greffe d'ovaires chez des souris hôtes immunologiquement non réactives. Beaucoup d'imprécisions existent dans les publications sur les conditions de séparation des ovaires et des tubules du rete ovarii avant la mise en culture des gonades. Dans nos expériences, la taille de l'ovaire d'embryon de brebis avant le 50^e jour et son mode de rattachement au mesonephros permettent de le disséquer parfaitement. Une telle dissection est plus difficile à réaliser sans précautions particulières avec un ovaire très jeune d'embryon de rat ou de souris. Dans le cas de l'ovaire de brebis, les premiers tubules du rete ovarii sont cependant observables à la liaison gonade-mésonephros dès le 28^e jour (MAULÉON, 1975). Le type de dissection que nous avons opéré ne ressemble pas à l'élimination totale permise par une localisation extra-ovarienne des tubules du rete ovarii d'embryon de souris de 12 jours telle que l'a pratiquée BYSKOV (1974). Nous ne pouvons cependant pas nier l'importance qu'une suppression involontaire, même partielle de la colonisation de la gonade par les cellules du rete ovarii a pu avoir dans les résultats que nous avons observés. A 47 jours, ces cellules peuvent n'avoir atteint que les gonies les plus internes et ce sont celles qui survivent le moins bien aux cultures organotypiques.

L'existence des relations cellules somatiques-cellules germinales expliquerait que, dans le cas des chimères expérimentales, peu de cellules germinales XX entrent en méiose : elles ne pourraient le faire que sous l'influence d'un tissu somatique XX proche. Toutefois, actuellement, on ne peut pas dire si de tels effets des cellules somatiques sur les cellules germinales dépendent du contact cellulaire direct ou d'un composé sécrété par les cellules somatiques.

3. *Un environnement hormonal général favorable* n'est pas une hypothèse à éliminer et une telle action peut être indirecte : les échanges des cellules somatiques du rete ovarii sont peut-être modifiables par un tel environnement aussi bien que le taux de multiplication de ces cellules, c'est-à-dire leur nombre.

Enfin, les autres phases de la méiose, comme la formation, et une évolution normale du complexe synaptinémal peuvent être plus directement dépendantes de ces facteurs hormonaux. Les expériences entreprises jusqu'ici à ce sujet restent confuses et critiquables chez la femelle.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. Michel TERRIOT pour les microphotographies jointes à ce texte. Ce travail a bénéficié de l'aide de la D. G. R. S. T., contrat n° 5221.

SUMMARY

IMPORTANCE OF VARIOUS OOGENETIC PERIODS IN THE
EMBRYONIC SHEEP GONAD :
CONTROL OF CHANGING MITOSIS IN MEIOSIS

The germ cells of the embryonic sheep gonad which enter into meiosis at the beginning, in the middle or at the end of the oogenetic period (52-82nd day) may participate in the constitution of the oocyte reserve : when injected at each day during this period, tritiated thymidine incorporated during premeiotic synthesis, strongly labels the oocytes of the 100th day ovary then in a such state. The variable proportion of oocytes originating from each of these days is maximal for the period 54-56 days and 62-64 days ; this proportion depends :

1) on the number of cells in premeiotic synthesis on each day, that is, on the scheme of oogonial mitosis. The shape of the curve of percentage of labelled oocytes and the variations in the frequency of oocytes with a labelling index > 4 , as a function of the day of injection is explained by a renewal of the generations of oogonial multiplication ;

2) on the intensity of the degenerative phenomena which destroy the greater part of oocytes originating from generations of multiplications begun after the 66th days.

During the period of premeiosis, there is a critical phase (47-50 days for the sheep embryo) after which meiosis *in vitro* occurs normally, but before which, modifications due to culture conditions suppress the appearance of meiotic figures. The germ cells during their *in vitro* period keep the potential to carry out the chain of reactions which induce meiosis (ovaries cultivated *in vitro* 10 days and grafted in host embryos). These results and those of recent works on this subject are discussed with the hypotheses of local or general environments favourable to the induction of meiosis and exchanges between germ cells and somatic cells.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAKER T. G., NEAL P., 1969. Effects of X radiation on mammalian oocytes in organ culture. *Biophysik*, **6**, 39-45.
- BAKER T. G., NEAL P., 1974. Oogenesis in human fetal ovaries maintained in organ culture. *J. Anat.*, **117**, 591-604.
- BLACK J. L., ERICKSON B. H., 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anat. Rec.*, **161**, 45-56.
- BLANDAU R. J., 1969. Observations on living oogonia and oocytes from human embryonic and fetal ovaries. *Am. J. Obstet. Gynec.*, **104**, 310-319.
- BLANDAU R. J., WARRICK E., RUMERY R. E., 1965. *In vitro* cultivation of fetal ovaries. *J. Fertil. Steril.*, **16**, 705-715.
- BORGHESE E., VENINI M. A., 1956. Culture *in vitro* di gonadi embrionali di mus. musculus. *Symposia Genetica*, **5**, 69-83.
- BOUSQUET J., 1967. Culture organotypique de fragments d'ovaires de ratte. Action de facteurs gonadotropes hypophysaires. *C. R. Soc. Biol.*, **161**, 778-782.
- BYSKOV A. G., 1974. Does the rete ovarii act as a trigger for the onset of meiosis? *Nature*, **252**, 396-397.
- CHALLONER S., 1975. Studies of oogenesis and follicular development in the Golden hamster. II. Initiation and control of meiosis *in vitro*. *J. Anat.*, **119**, 149-156.

- ERICKSON G. F., 1974. The control of the differentiation of female embryonic germ cells in the bird. *Dev. Biol.*, **36**, 113-129.
- LAZAR P., GERARD-MARCHANT R., 1965. Une technique de représentation graphique des numérations de grains sur auto-historadiographie. *Ann. Histochim.*, **10**, 43-52.
- LUCIANI J. M., DEVICOR-VUILLET M., CAGNE R., STALL A., 1974. An air-drying method for first meiotic prophase preparations from mammalian ovaries. *J. Reprod. Fert.*, **36**, 409-411.
- McLAREN A., CHANDLEY A. C., KOFMAN-ALFARO S., 1972. A study of meiotic germ cells in the gonads of foetal mouse chimaeras. *J. Embryol. exp. Morph.*, **27**, 515-524.
- MARTINOVITCH P. N., 1938. The development *in vitro* of the mammalian gonad ovary and oogenesis. *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, **125**, 232-249.
- MAULEON P., 1961a. Déroulement de l'ovogenèse comparé chez différents mammifères domestiques. *Proc. IVth Cong. intern. Reprod. anim.*, La Haye, **2**, 348-354.
- MAULEON P., 1961b. Utilisation de la colchicine dans l'étude des divisions goniales de l'ovaire d'embryon de brebis et analyse de quelques résultats. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 70-73.
- MAULEON P., 1967a. Cinétique de l'ovogenèse chez les mammifères. *Archs. Anat. Micr. Morph. exp.*, **56** (Suppl. 3-4), 125-156.
- MAULEON P., 1967b. Oogenesis and folliculogenesis. In *Reproduction in Domestic Animals*, COLE et CUPPS Ed., Acad. Press Publ., 2^e Ed., Chapter 7.
- MAULEON P., 1973. Modification expérimentale de l'apparition et de l'évolution de la prophase méiotique dans l'ovaire d'embryon de brebis. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **13** (hors série), 89-102.
- MAULEON P., 1974. The establishment of the primordial follicle reserve in the sheep embryo studied by labelling of oocytes with tritiated thymidine. *Europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol.*, **4**, Suppl. 4, 133-139.
- MAULEON P., 1975. Migratory phase of germ cells and sexual differentiation of the gonad in sheep embryo. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, (A paraître).
- MYSTOWSKA E. T., TARKOWSKI A. K., 1970. Behavior of germ cells and sexual differentiation in late embryonic and early postnatal mouse chimeras. *J. Embryol. exp. Morph.*, **23**, 295-405.
- ODOR D. L., BLANDAU R. J., 1971. Organ culture of foetal mouse ovaries. *Am. J. Anat.*, **131**, 387-396.
- OGAWA W., 1968. Studies on the oogenesis of the mice embryos using tissue culture method. *Jap. J. Fert. Steril.*, **13**, 64-78.
- RUDKIN G. T., GRIECH H. A., 1961. H³-thymidine labelling of foetal mouse oocyte nuclei. *J. Histochem. Cytochem.*, **9**, 621 (Abstr.).
- RUDKIN G. T., GRIECH H. A., 1962. On the persistence of oocyte nuclei from fetus to maturity in the laboratory mouse. *J. Cell. Biol.*, **12**, 169-176.
- SALZGEBER B., 1962. Étude du développement de l'ovaire de souris greffé dans l'embryon de poulet après culture *in vitro*. *Archs Anat. Micr. Morph. exp.*, **51**, 1-10.
- WOLFF E., 1952. Sur la différenciation sexuelle des gonades de souris explantées *in vitro*. *C. R. Acad. Sc., Paris, Ser. D*, **234**, 1712-1714.

PLANCHE I

*Localisations différentes dans le cortex des ovocytes
fortement marqués (ayant incorporé la thymidine tritiée
pendant la synthèse d'ADN préméiotique ou proche de ce
moment) en fonction du jour d'injection
du radioélément*

1. Injection le 56^e jour de la vie embryonnaire. Localisation profonde.
2. Injection le 64^e jour de la vie embryonnaire. Localisation moyenne.
3. Injection le 72^e jour de la vie embryonnaire. Localisation superficielle.

Ovocytes très marqués localisés par une flèche. Autoradiographie : film Ilford K5-Feulgen.

PLANCHE II

Cultures *in vitro* associées d'ovaires d'embryon de brebis explantés à des âges différents (49 et 60 jours).

1° Grossissement $\times 70$ montrant les deux gonades « cultivées » pendant 10 jours soudées au niveau des flèches.

2° Grossissement $\times 285$ montrant :

- partie de gauche : la gonade prélevée *avant* la « phase critique » *sans* figures de prophase méiotique à la fin de la culture *in vitro*,
- partie de droite : la gonade prélevée *après* la phase critique *avec* figures de prophase méiotique (quelques-unes sont identifiées sur la planche).

Fixation Bouin Hollande sublimé. Coloration de Feulgen.

PLANCHE III

Aspects cytologiques de noyaux de cellules germinales (Embryon de brebis) (Grossissement $\times 2.700$).

Stades ultimes de la méiose atteints en culture *in vitro* lorsque la gonade femelle est prélevée avant le 50^e jour de la vie de l'embryon. Stades comparables trouvés *in vivo*.

1^o Leptotène en « boule ». Ovaire prélevé à 49 jours, mis en culture pendant 8 jours.

2^o Leptotène de forme semblable trouvé uniquement en fin de période ovogénétique. Embryon de 80 jours.

3^o Leptotène normal. Ovaire prélevé à 49 jours et mis en culture pendant 8 jours.

4^o Leptotène normal. Ovaire témoin de 57 jours.

Fixation alcool-acide acétique. Coloration orcéine lactique acétique.

PLANCHE IV

Aspects cytologiques de noyaux de cellules germinales (Embryon de brebis) (Grossissement $\times 2.700$).

Stades considérés comme antérieurs et postérieurs à ceux trouvés dans les ovaires explantés avant le 50^e jour et mis en culture *in vitro*.

1 et 2 : Stades préleptotène.

3 et 4 : Stades zygotène. Un tel appariement des filaments chromosomiques n'est jamais observé *in vitro* pour des prélèvements antérieurs à la « période critique ».

Fixation alcool-acide acétique. Coloration orcéine lactique acétique.