

# ÉTUDE DE LA CHONDROGÉNÈSE VERTÉBRALE CHEZ L'EMBRYON DE SOURIS. INFLUENCE D'UNE IRRADIATION TÉRATOGENÈSE AUX RAYONS X

## II. — MORPHOGENÈSE DES MALFORMATIONS ENTRE LE 10<sup>e</sup> ET LE 18<sup>e</sup> JOUR

Madeleine NOVEL

*Laboratoire de Biologie,  
Institut national des Sciences appliquées de Lyon, 69 - Villeurbanne*

---

### SOMMAIRE

Une étude topographique et histologique du développement vertébral embryonnaire de la Souris après une irradiation *in utero* a été réalisée. La diversité des anomalies observables à la naissance et leur répartition caractéristique peuvent s'expliquer par les asynchronismes de développement lors de la restauration, conjugués avec la différence de réponse des deux processus essentiels de la morphogénèse, les mouvements et la différenciation.

---

### INTRODUCTION

Nous avons montré, NOVEL (1969), comment se répartissent, au terme du développement, les anomalies vertébrales engendrées, chez la Souris, par une irradiation au dixième jour de la vie intra-utérine. Les centres vertébraux, en particulier, manifestent pour certaines anomalies une régionalisation admettant un centre de symétrie méso-troncal.

En analysant le déroulement des événements morphogénétiques à partir du moment de l'irradiation, nous avons recherché l'origine de cette disposition topographique, et tenté de dégager quelques mécanismes de cette tératogénèse. La rapidité et la complexité des processus organogénétiques rendent indispensables, dans un premier temps, l'établissement, pour le développement normal, d'une chronologie précise.

I. — PÉRIODE COMPRISE ENTRE LE 10<sup>e</sup> ET LE 12<sup>e</sup> JOUR

## A. — Développement normal

L'irradiation frappe l'embryon en pleine période d'organogenèse. Au niveau des ébauches vertébrales, cette activité morphogénétique réside essentiellement dans la mise en place d'une formation médiane à partir de matériel provenant des somites pairs situés latéralement. Décrivons brièvement les principales étapes de ce processus.

a) *Neuf jours à neuf jours et demi.*

*La structure du tronc au début du neuvième jour est encore simple.*

Dans l'axe médian, le volumineux tube neural est flanqué des ébauches ganglionnaires ; ventralement, pincée entre ce dernier et l'aorte, se trouve la corde. Latéralement, on distingue la succession des vésicules somitiques.

Le tube neural consiste en une épaisse couche dense de cellules aux noyaux allongés radialement, la couche épendymiale primaire, entourée d'une assise externe de cellules sphériques, la couche marginale.

Les vésicules somitiques amorcent leur évolution. Tandis que le feuillet externe, ou dermatome, conserve l'épithélium cylindrique du stade antérieur, en relation avec la basale adjacente, le mur entier du feuillet interne se démantèle (DAWES, 1930) et se scinde en deux territoires différents. Contre le myocèle, les cellules acquièrent une orientation longitudinale, en même temps qu'elles augmentent de taille : ces caractères permettent de reconnaître le myotome. Sur la face interne de ce massif, les cellules se résolvent en mésenchyme. Leur masse, légèrement condensée, de forme triangulaire, annonce le sclérotome. En avant de la dichotomie aortique, la structure somitique devient plus massive et confuse. Dans la zone pelvienne et caudale au contraire, la structure reste plus schématique, simplifiée par rapport à la zone moyenne.

L'activité mitotique, intense sur le bord épendymial de la moelle épinière, est modérée dans le somite et tout le mésenchyme.

b) *Neuf jours et demi à dix jours.*

Les différentes parties du somite prolifèrent intensément. C'est ainsi que le dermatome devient bistratifié, que le nombre des cellules myotomiales croît, et que le sclérotome s'individualise franchement. En coupe tangentielle, on perçoit la subdivision en deux sclérotomites : un antérieur, ou crânial, assez lâche, traversé par le nerf rachidien et l'artère intersegmentaire ; un postérieur, ou caudal, dense et continu (fig. 2). En outre, on devine qu'un mouvement est imprimé à ces cellules grâce à l'orientation de la trame conjonctive et des prolongements cytoplasmiques, tournés en direction de la corde.

c) *Dix jours à dix jours et demi.*

La disposition générale reste la même, mais *les résultats de la prolifération commencent à se faire sentir*. La multiplication cellulaire au niveau de la calotte dermatomiale en masque progressivement la structure. Les myoblastes, de plus en plus allongés longitudinalement, forment une plaque bien différenciée sur la face interne du massif dermatomial (fig. 2, 12).

Les sclérotomites crâniens se densifient légèrement autour du nerf, tandis que les sclérotomites caudaux avancent une pointe en direction de la corde, pointe qui dépasse l'angle inférieur du tube neural, sans que la densité cellulaire dans cette zone avancée atteigne celle de la portion plus latérale (fig. 1). Les deux ou trois premiers segments céphaliques ont réalisé la fusion médiane des deux sclérotomites pairs.

d) *Dix jours et demi à onze jours.*

A 10 jours et demi, nous entrons dans une autre phase du développement caractérisée par deux phénomènes majeurs : *l'apparition du précartilage dans l'axe des membres, et la fusion médiane des sclérotomites denses.*

α) *Apparition du précartilage dans les membres.*

Les blastèmes fortement condensés de la ceinture scapulaire et des stylo-podes montrent en leur centre une mince trame fibreuse exocellulaire métachromatique, alcianophile, et incorporant le sulfate marqué. Ce précartilage n'a, à part cette activité de synthèse, encore aucune caractéristique histologique du cartilage, mais au contraire se relie très fortement au conjonctif dont il provient. Son aspect est par exemple peu différent de celui qu'une autre formation conjonctive, le derme, présente par endroits au même stade.

Mais bientôt l'évolution du processus conduit à l'isolement des cellules, entourées chacune d'une sorte de halo incolore ; parfois deux cellules partagent la même aire. La zone centrale du blastème, la plus évoluée, présente un épaississement des lames métachromatiques, enchevêtrées en paquets d'un rouge très intense, aux dépens, semble-t-il, de cette zone péricellulaire vide, les noyaux conservant le même espace-ment (fig. 4).

β) *Fusion médiane des sclérotomites caudaux.*

Ce mouvement morphogène se produit progressivement de l'avant à l'arrière au cours de cette période, au terme de laquelle la liaison est établie au niveau des vertèbres cervicales et thoraciques, mais pas encore réalisée sur les dernières vertèbres lombaires. L'aspect cellulaire est toujours celui d'un blastème indifférencié. La zone de fusion est si mince que le moindre défaut d'orientation de la coupe peut empêcher de la voir en totalité.

γ) *Évolution des sclérotomites crâniens.*

A leur niveau, on peut noter la condensation autour de la corde de quelques assises cellulaires formant une gaine périchordale. Ainsi pour ces sclérotomites, il semble qu'il n'y ait pas de mouvement, mais une densification sur place, soit autour de la corde, soit autour des nerfs rachidiens.

En outre, le tissu acquiert quelques caractères de différenciation. On relève une raréfaction des grands espaces intercellulaires optiquement vides, une trame conjonctive plus fournie, et une légère colorabilité de la matrice interstitielle (fig. 5). Les nombreuses connections intercellulaires semblent conservées.

e) *Onze jours à onze jours et demi.*

Les membres poursuivent le processus engagé durant la demi-journée précédente. La condensation axiale est mieux individualisée, sa métachromasie ainsi que celle de la ceinture, se précise.

Au niveau somitique, la prolifération cellulaire continue, et la différenciation n'a pas encore démarré. Aussi la topographie doit-elle venir au secours de l'histologie pour relater les événements de ce stade, qui concernent surtout les *modifications territoriales des différentes ébauches*. C'est ainsi que les myotomes se renflent, et les ganglions rachidiens occupent davantage de place ; simultanément, les sclérotomites caudaux sont repoussés vers l'arrière, et on observe ainsi une alternance des territoires musculaires et osseux (STRUDEL, 1962) ; c'est la segmentation secondaire, ou resegmentation (DEVILLERS, 1954). Ce mouvement paraît sensiblement synchrone. Les ébauches vertébrales s'étendent vers le haut et vers le bas. La branche ascendante représente le futur arc neural, tandis que la branche inférieure est précostale.

f) *Onze jours et demi à douze jours.*

*C'est au tour de la colonne vertébrale de franchir l'étape décisive de la chondrification.* Les condensations provertébrales dessinent maintenant le contour des centres vertébraux, avec leur forme caractéristique, rectangulaire ou en V. Elles ne possèdent pas encore de périchondre. Les points de chondrification apparaissent tout d'abord dans le centre vertébral, de part et d'autre de la corde, et dans le mince arc dorsal, puis peu après, à la base des côtes et dans l'arc ventral. L'autoradiographie, peut-être davantage que l'histologie, permet de souligner la dualité des foyers au niveau du centre vertébral, par une particulière intensité du marquage au cœur de ces foyers (fig. 3). La différenciation suit les mêmes processus que ceux décrits pour le membre, c'est-à-dire ceux du type « dense ».

Les zones intervertébrales, dont l'évolution a démarré plus tôt et s'est poursuivie de façon beaucoup plus discrète, ont néanmoins acquis maintenant une structure individualisée. Le contour en est dessiné. La densité cellulaire est devenue moyenne, la gaine périchordale a disparu de ce fait. La substance fondamentale, toujours abondante, a pris un caractère plus spécifiquement cartilagineux en noyant le réseau des connections cellulaires.

Il faut mentionner un phénomène qui, bien qu'imperceptible à son début, revêt cependant une grande importance. C'est le *nouvel asynchronisme longitudinal de la différenciation*.

A 11 jours et demi, les ébauches vertébrales incorporent le radiosulfate aussi bien dans la zone postérieure que dans une zone plus antérieure. Un jour et demi plus tard, l'activité vertébrale, qui s'est beaucoup plus accrue, est légèrement plus intense dans la zone thoracique et lombaire. Les vertèbres moyennes du tronc ne montrent donc plus le retard de développement que présentaient les somites correspondants quelques jours auparavant. Leur vitesse de développement doit être plus rapide, et en effet ce sont elles qui s'ossifient les premières, avec deux jours d'avance sur les vertèbres cervicales, comme nous l'avons vu dans la première partie. Il s'ensuit que l'état indifférencié de l'ébauche vertébrale est plus bref dans cette zone moyenne du tronc. Cet état de fait aura son importance pour expliquer les conséquences de l'irradiation. Les arcs ne présentent pas la même chronologie. Pour la chondrification, et plus tard pour l'ossification, ce sont les plus antérieurs qui sont les plus développés.

Au cours du douzième jour se produit la coalescence des deux foyers bilatéraux de chondrogenèse, dont la dualité n'aura été que fugitive. On peut observer la constriction progressive de la corde au niveau du centre, et son évolution en *nucleus*

*pulposus* au niveau des intercentres. Le cartilage hyalin prend son aspect typique, encapsulé (fig. 6).

Avant de clore cette description du développement normal, donnons quelques indications sur la *présence d'acide ribonucléique*, décelée par la coloration d'Unna. Il est connu que la richesse des tissus embryonnaires en ARN est liée à leur activité organisatrice (MILLAIRE, 1963 ; LASH, 1963). Une coupe transversale d'un embryon de 9 ou 10 jours montre une très intense coloration des formations neurales et somitiques, alors que l'ensemble des tissus n'est que médiocrement coloré. Des trois dérivés du somite, c'est le dermatome qui est le plus vivement pyroninophile. Nous notons que la coloration envahit toute la surface cellulaire, même lorsque celle-ci comporte des prolongements cytoplasmiques fins.

Dans les jours qui suivent, la coloration s'atténue dans les ébauches cités plus haut, à l'exception des ganglions rachidiens, tandis qu'elle se renforce dans d'autres ébauches, le mésonéphros par exemple. Au niveau des sclérotomes, la coloration n'occupe plus tout le cytoplasme, mais se cantonne à un pôle seulement, prenant un aspect en calotte. En outre, seule la portion haute du sclérotome, adossée au myotome, est pyroninophile. La portion proche de la chorde, c'est-à-dire qui a subi le mouvement, ne l'est plus.

En résumé, au moment où frappera l'irradiation, les territoires vertébraux sont caractérisés par :

- une forte activité de prolifération,
- une grande richesse en ARN,
- des mouvements morphogénétiques qui conduisent dans la journée qui suit à la constitution des ébauches vertébrales impaires et médianes,
- un état encore indifférencié des cellules, qui n'acquerront des caractères de différenciation chondrogène que 36 heures plus tard.

### B. — *Conséquences de l'irradiation*

L'étude du développement normal vient de nous apporter un premier élément de réponse : à 10 jours, l'asynchronisme longitudinal est encore céphalocaudal ; seules les premières paires cervicales de sclérotomes ont opéré leur fusion médiane, et au cours de cette journée, les suivantes jusqu'aux dernières lombaires la réalisent de façon de plus en plus ténue. Cette disposition ne préfigure donc en rien la régionalisation des malformations observables à la naissance. Par contre, une certaine relation s'est fait jour entre l'apparition de la différenciation cartilagineuse à 11 jours et demi, et cette localisation. Il convient donc d'examiner le déroulement des événements pendant cet intervalle de temps (10 à 11 jours et demi).

#### a) *Le dixième jour.*

L'action immédiate de l'irradiation revêt deux aspects principaux : nécrose et arrêt des divisions cellulaires. C'est celui-ci qui, le premier, confère un aspect visiblement anormal à l'embryon, les mitoses étant toujours abondantes à ce stade du développement. Seuls les organes particulièrement radiorésistants, comme le cœur, échappent à cette inhibition.

Durant les dix premières minutes, il y a maintien d'un aspect pseudo-normal du fait que les divisions qui étaient en cours au moment de l'irradiation s'achèvent (fig. 7). Ensuite, pour un délai de trois heures, elles deviennent nulles ou du moins

exceptionnelles (fig. 8). Puis elles réapparaissent progressivement, et l'on peut considérer que 20 heures après le traitement, le taux mitotique est redevenu normal, sinon légèrement supérieur du fait d'une certaine synchronisation.

Mais à mesure que les mitoses reprennent, ce sont les nécroses qui apparaissent et s'étendent pendant 24 heures, frappant soit le noyau, soit le cytoplasme où l'ARN se condense en une grosse flaque (fig. 14).

On peut résumer en un tableau la chronologie de ces événements au niveau des organes radiosensibles :

Temps après l'irradiation	0	10 mn	30 mn	3 h	7 h	20 h	24 h
Fréquence des mitoses	+ + +	+ +	except.	+	+ +	+ + +	+ + +
Fréquences des nécroses				+	+ + +	+ + +	+

Pour avoir une idée de la radiosensibilité sclérotomiale par rapport à celle des tissus avoisinants, passons brièvement en revue l'état des principaux territoires embryonnaires. Les tissus les plus touchés sont la moelle épinière et les dermatomes. Ceux-ci sont souvent détruits à 90 p. 100 (fig. 11 et 13), et les mitoses reprennent peu, car ces feuilletés étaient arrivés à la fin de leur période de prolifération. Il s'ensuit que les dégâts paraissent à peu près irrémédiables sur les dermatomes. Quant au tube neural, une grande proportion des cellules épendymiales est détruite (fig. 9) alors que la couche palléale naissante plus différenciée n'est pas endommagée. Les mitoses reprendront assez vite sur le bord du canal (fig. 9) et reformeront une assise épaisse, qui repoussera vers la périphérie des cellules lysées (fig. 10). Cependant, il arrive qu'en certains points particulièrement endommagés, la couche marginale elle-même est désagrégée, et le tube neural rompu. La reconstitution médullaire semble alors devenir plus aléatoire.

Certains tissus au contraire sont spécialement peu touchés. Le myocarde, absolument indemne, continue à se développer. Les myotomes accusent une légère diminution des mitoses, qui n'étaient du reste pas fréquentes à ce stade, mais aucune trace de nécrose (fig. 11 et 13). Le mésenchyme ne montre que de rares nécroses (fig. 15, 16).

La radiosensibilité des sclérotomes se situe à mi-chemin de ces deux réactions extrêmes (fig. 13, 15, 16). Ce degré moyen de radiosensibilité semble être le fait également d'autres territoires présentant au même moment un degré équivalent de condensation et de prédifférenciation, les arcs branchiaux par exemple.

On peut estimer entre 30 et 50 p. 100 le nombre des cellules sclérotomiales qui dégèrent pendant cette première journée, préférentiellement à la base de la formation. Dès la 3<sup>e</sup> heure, les mitoses reprennent, après un arrêt total, avec une intensité moyenne et en commençant par les zones les moins nécrosées. Ensuite la continuité tissulaire se rétablit, les prolongements cytoplasmiques chevauchant les débris cellulaires encore en place pour reconstituer une trame. La morphogenèse va pouvoir reprendre.

*Discussion.*

Nos conditions d'irradiation provoquent un arrêt total et momentané des mitoses dans la plupart des organes, et en particulier les somites. C'est plus qu'il n'en faut pour provoquer la tératogenèse. LE DOUARIN (1963) obtient de nombreuses anomalies cardiaques chez l'embryon de poulet avec une dose qui n'entraînait qu'un fléchissement de 50 p. 100 de l'index mitotique.

Diverses remarques peuvent être faites sur les relations entre mitoses, nécroses, et radiosensibilité.

— La radiorésistance d'un tissu concerne non seulement la survie cellulaire, mais aussi son activité de prolifération, puisqu'un organe totalement radiorésistant à 300 r, comme le cœur, n'interrompt pas sa multiplication, et un organe peu sensible comme le muscle ne montre qu'une brève interruption.

— Les rayons X ne bloquent pas directement les mitoses dans les zones radiosensibles. Celles qui étaient en cours s'achèvent. Par contre, lors de la reprise, on observe de nombreuses figures aberrantes, telles que ponts chromosomiques et ruptures de chromosomes.

— Les dommages peuvent être directement compensés par le phénomène de restauration, lui-même lié aux potentialités des tissus dans la journée qui suit le choc. SKALKO (1965) a montré que le tube neural produisait une génération cellulaire en 6 heures, ce qui permettait la récupération rapide du tissu. A l'opposé, le dermatome qui achevait sa prolifération, n'est pas restauré. Remarquons que la reprise des mitoses, lorsque celles-ci ne sont pas cantonnées à une seule assise proliférante, se localise d'abord dans les zones les moins sévèrement touchées. C'est ainsi qu'au niveau du membre par exemple, les nécroses étant surtout proximo-ventrales, les mitoses sont préférentiellement dorsales et sous-apicales. Les sclérotomes également montrent d'abord les figures de division latéro-dorsales. Cependant la présence de ces mitoses n'a rien d'anormal. Elle n'est pas supérieure à l'activité montrée par les mêmes régions, chez des témoins de même stade. Si donc l'inhibition de mitose est moins forte, il ne semble pas y avoir de stimulation mitotique (aux doses utilisées).

Pour conclure cette analyse de la réponse immédiate des sclérotomes aux rayons X, nous soulignerons deux points essentiels.

Tout d'abord, l'ensemble du sclérotome paraît se comporter de façon sensiblement uniforme face à l'irradiation. A peine peut-on distinguer une légère augmentation des nécroses à la base, c'est-à-dire sur les cellules qui ont effectué le plus grand déplacement. Cette relative uniformité traduit l'homogénéité non seulement de l'origine de la population cellulaire mais également de son degré d'évolution.

En outre, on remarque la grande importance et la grande rapidité des phénomènes de restauration, qui se traduisent par la reprise des mitoses, et le rétablissement de la continuité cellulaire.

*b) Le onzième jour.*

Vingt-quatre heures après l'irradiation, le processus crucial de la restauration semble bien se situer au niveau de la continuité du tube neural. Certains embryons de 11 jours et demi montrent des mitoses mésodermiques, mais aucune dans le tissu neural, et la réorganisation de la moelle épinière ne s'est pas amorcée. Par endroits, celle-ci présente des ruptures complètes. Or chez ces mêmes embryons, les critères métabo-

liques donneront des valeurs aberrantes, ce qui laisse supposer que ces embryons sont voués à une mort prochaine.

Par contre, les embryons qui satisfont à ce critère de continuité spinale montrent une assez grande uniformité de comportement physiologique. Les mitoses ont repris ; mais certaines divisions sont atypiques, ce qui laisse prévoir qu'un certain nombre de cellules ne seront pas viables. En effet, les nécroses persistent et la densité cellulaire est souvent encore faible.

La fusion sclérotomiale dans le plan médian peut être en retard. En effet, à onze jours, et parfois même à onze jours et demi, il arrive qu'elle ne soit pas réalisée dans la zone moyenne et postérieure du tronc, c'est-à-dire au niveau du foie et des reins (fig. 18). Cet effet est très variable : il affecte 30 à 85 p. 100 des embryons, lorsque la portée a reçu 300 roentgens. Par contre, après 400 r, 100 p. 100 des embryons le manifestent. D'autre part, là-même où les sclérotomes ont établi le contact, celui-ci est extrêmement limité ; il ne peut être suivi que sur une ou deux coupes, ce qui correspond à 15  $\mu$  au maximum. Il n'y a pas de cas, cependant, où nous n'ayons observé finalement la constitution d'une ébauche médiane impaire du centre vertébral (fig. 19).

L'événement morphogénétique suivant, qui est l'apparition de la différenciation cartilagineuse ne semble pas présenter le même retard, et il peut survenir très rapidement après la fin du mouvement. On observe les faisceaux de fibres métachromatiques caractéristiques du précartilage, puis bientôt les capsules alcianophiles dans les différents foyers de chondrification. Mieux encore que la colorabilité histologique, c'est l'autoradiographie qui rend le mieux compte de ce démarrage. Elle permet d'observer que l'écartement entre les deux foyers bilatéraux de chondrogenèse des centres peut être accentué, laissant une zone médiane relativement large dépourvue de marquage. La densité cellulaire du corps vertébral nouvellement constitué est variable. Il arrive qu'elle soit particulièrement faible (fig. 19), mais elle peut au contraire être pratiquement normale (fig. 17). Notons également la présence d'œdèmes hémorragiques, provoquant des ruptures tissulaires.

#### *Discussion.*

Les phénomènes observés durant ce 11<sup>e</sup> jour sont particulièrement importants, car ils semblent contenir une grande part de la causalité des malformations observables à la naissance. Ils sont triples :

- formation de zones hémorragiques,
- inhibition momentanée des mouvements morphogènes, puis leur reprise,
- intervention de la différenciation chondrogène sans retard visible.

*Formation de zones hémorragiques.* — Les ruptures tissulaires qui les accompagnent peuvent provoquer la déformation des pièces squelettiques : côtes ou membres en particulier. SALZGEBER (1966) a montré le rôle important de ces réactions dans la tératogenèse provoquée chez l'embryon de poulet par l'ypérite nitrée, JOHNSON (1967) dans celle qui intervient sur un mutant « extra-toes » de souris. Nous reviendrons ultérieurement sur les conséquences de l'œdème supraneural fréquemment observé.

*Mouvements morphogènes et différenciation.* — On doit remarquer que la réunion sclérotomiale finit toujours par se produire, quoique la densité cellulaire dans la zone

de jonction soit fort variable. Il est probable que le déplacement est un processus actif, et non le seul résultat d'une poussée liée à l'extension d'un massif cellulaire dans la direction de moindre résistance.

En outre il a été observé que si l'irradiation n'empêche jamais la réunion médiane des sclérotomites, néanmoins les foyers de différenciation peuvent se trouver anormalement écartés : on doit en conclure que les mouvements se font en deux temps. (« Loi d'union des parties similaires » WOLFF, 1936).

Dans une première phase, il y a établissement du contact entre les deux territoires homologues, puis dans une deuxième période, il y a une réorganisation profonde. Enfin le signal de la fin du mouvement semble être donné par l'apparition de la différenciation. La sécrétion de substance fondamentale qui en est le signe dans le cas du cartilage rend cette perte de plasticité aisément admissible.

L'inhibition de mouvement provoquée par l'irradiation ralentit la première phase, et d'autre part la différenciation survient en temps normal. Il s'ensuit que le temps imparti à la seconde phase se trouve abrégé.

On comprend alors pourquoi la zone moyenne du tronc, qui nous l'avons vu plus haut, demeure moins longtemps que le reste de la colonne dans cette période qui s'étend de la fin de la translation au début de la différenciation, soit plus particulièrement frappée par cette anomalie, qui conduira à l'*ossification bilatérale*. Dans la zone thoracique antérieure, le déplacement des sclérotomes commencé plus tôt et poursuivi plus longtemps, a le temps de s'achever. Les pertes cellulaires entraînent alors une *réduction*.

La *fusion* des centres doit être bien distinguée de la confusion intersegmentaire (RUSSELL et RUSSELL, 1954), qui se produit très largement après une irradiation plus précoce (7 jours 1/2), et qui résulte d'une mauvaise métamérisation des somites. Celle que nous observons ici, plus limitée, est liée à la segmentation secondaire (AREY, 1954). C'est donc encore là un antagonisme entre mouvement morphogénétique et différenciation. Cette anomalie ne montre pas de localisation préférentielle (voir 1<sup>re</sup> Partie), ce qui tend à indiquer que ce mouvement, difficile à observer, est synchrone.

### C. — Conclusion

On voit que la régionalisation des malformations n'est pas un effet direct des rayons X, ce qui était difficile à concevoir *a priori*, puisque l'hétérogénéité topographique n'admettait pas la même répartition à 10 jours. Mais elle est une conséquence de l'interférence entre les processus de restauration concernant les événements morphogénétiques touchés par l'irradiation (prolifération-mouvement) et les événements morphogénétiques suivants (chondrification), non touchés par l'irradiation, qui ne présentent plus le même décalage dans le temps avec les premiers. Il faut citer ici les travaux de STRUDEL (1966) qui en procédant à une ablation beaucoup plus précoce du matériel somitique, obtient une totale réorganisation des vertèbres chez l'embryon de Poulet. Au stade où nous irradiions, cette réorganisation n'a pas le temps de s'achever. Il reste à savoir si la différenciation chondrogène, bien qu'apparue sans retard, est absolument normale, et si les « absences d'ossification » (NOVEL, 1969) ne sont pas dues à son ralentissement. Ceci nous conduit à étudier la morphogenèse au cours des jours suivants.

## II. — PÉRIODE COMPRISE ENTRE LE 13<sup>e</sup> ET LE 18<sup>e</sup> JOUR

En même temps que s'édifie le squelette, les déformations engendrées par les rayons X apparaissent. On s'aperçoit alors que leur évolution, à partir du schéma que nous avons dressé au seuil du douzième jour, est plus ou moins rapide ; il est donc nécessaire d'observer encore une étape intermédiaire dans cette dernière partie de notre étude.

### a) Quatorzième et quinzième jours

L'évolution normale conduit à quatorze jours, à des centres vertébraux déjà bien constitués ; le double foyer de chondrification n'est plus perceptible. Les arcs neuraux contournent l'angle supérieur de la moelle épinière. Les deux premières vertèbres accomplissent les transformations qui conduisent à l'absorption d'une partie de l'atlas par l'axis : leur comportement est tout à fait particulier, et nécessiterait une étude spéciale, que nous n'avons pas entreprise dans le cadre de ce travail. A quinze jours, la corde disparaît des centres, expulsée vers le haut dans les premières vertèbres cervicales, noyée au sein des autres, tandis qu'au niveau des disques se développe le volumineux *nucleus pulposus*.

La différenciation cartilagineuse est remarquablement homogène, et par conséquent l'incorporation uniforme. Les ébauches de côtes, d'arcs, de centres montrent un noircissement d'égale intensité. Seuls les disques tranchent par leur réaction beaucoup plus faible.

Les animaux irradiés présentent déjà des malformations anatomiquement visibles. Citons en particulier la fusion et l'angulation (au sens large) des côtes, ainsi que la réduction des centres. Celle-ci peut conserver aux centres leur forme approximative, ou bien les frapper plus spécialement dans une de leurs dimensions. On remarque également des *nucleus pulposus* exagérément volumineux par rapport à la taille des vertèbres, et occupant pratiquement toute la hauteur du disque. Dans ce cas, l'affaiblissement du marquage présent normalement dans la zone vertébrale, prend une extension exagérée dans la direction antéro-postérieure (fig. 31). Cette zone médiane inactive peut aller jusqu'à scinder en deux le centre qu'elle a envahi. Localement aussi, sur le pourtour des centres, on peut voir une perte d'incorporation (fig. 30). Ailleurs, l'incorporation est très intense, quelles que soient les malformations (fig. 29).

### b) Dix-huitième jour

Les déformations anatomiquement décelables dont nous venons de parler sont davantage accusées : scission et réduction des centres (fig. 24, 25, 28), anomalies costales. Il arrive que les arcs n'aient pas réalisé leur suture dorsale, qui devrait normalement s'être produite à ce stade ; dans ce cas, on peut observer une extrusion de la moelle épinière (fig. 26). Il est possible que l'obstacle à la fermeture de l'arc neural soit l'œdème supra-médullaire fréquemment formé dans cette dernière phase du développement tératologique. La déviation du mouvement morphogène des arcs dorsaux

provoque leur extension transversale, et entraîne la *fusion* des arcs voisins. Cette évolution tardive est évidemment sans aucun rapport avec les anomalies des centres correspondants, comme l'étude numérique nous l'avait montré.

Sur le pourtour de certains centres, on remarque des échancrures comblées par du tissu fibreux (fig. 26). Elles correspondent peut-être à l'évolution des aspects montrés dans les figures 30 et 31 et tradiraient, dans ce cas, une involution du tissu cartilagineux ou bien un envahissement par du périchondre après disparition totale.

Cela nous conduit à parler d'une nouvelle catégorie d'anomalies concernant des régions histologiquement bien constituées, et cependant aberrantes dans leur comportement métabolique. A côté de l'incorporation de radiosulfate, un nouveau critère est utilisable maintenant, c'est la présence de phosphatase alcaline qui est un bon indice du démarrage de l'ossification.

— <sup>35</sup>S : je n'ai jamais observé, au dix-huitième jour, d'anomalies dans l'incorporation du sulfate sur les vertèbres thoraciques et lombaires. Au niveau des vertèbres cervicales, par contre, on relève des particularités d'aspect. En effet, une absence de marquage peut affecter une zone plus ou moins large, et jusqu'à la moitié d'un centre (fig. 27). L'histologie montre dans ces mêmes régions de belles capsules, fortement métachromatiques.

— Phosphatase alcaline : à dix-sept jours, elle envahit les arcs, les côtes, et débute dans les centres thoraciques et lombaires (fig. 20). Dans ces derniers, sa localisation normale est médiane, hormis une légère dichotomie postérieure pour contourner le *nucleus pulposus*. Après irradiation, cette bipartition est parfois beaucoup plus importante, elle peut concerner tout ou partie du centre (fig. 21, 22). A la limite, elle donne l'impression d'une fragmentation en plusieurs foyers distincts (fig. 23). Entre ces sites d'ossification ainsi séparés, le cartilage n'a histologiquement rien d'aberrant. On voit l'intérêt d'une telle étude métabolique pour tester l'activité cellulaire et déceler une éventuelle hétérogénéité.

### Discussion.

L'étude des malformations au 14<sup>e</sup> et au 18<sup>e</sup> jour nous conduit à distinguer parmi elles trois grands groupes suivant leur apparition plus ou moins précoce au cours du développement.

1. Le premier groupe englobe les malformations qui sont apparues avant le 14<sup>e</sup> jour, puisqu'elles sont histologiquement et métaboliquement redevenues normales dès ce jour-là. Parmi celles-ci, citons les lésions des côtes (angulation, fusion...) et la réduction des centres. On remarque qu'elles s'accompagnent d'une certaine régularisation de la forme. Cette dernière s'explique si l'on considère que la différenciation dans les zones affectées par ce type d'anomalie, est relativement tardive. Le temps écoulé entre l'irradiation et l'apparition du cartilage a dû être suffisant pour que le matériel restant ait pu subir un remodelage avant d'avoir perdu toute plasticité.

Les fusions arcuales sont à classer au voisinage du groupe précédent, car elles relèvent vraisemblablement du même type de genèse. En effet, l'hypothèse de l'œdème supra-neural, présentée par JOHNSON (1967) à propos de la fusion des arcs chez une Souris mutante (Extra-toes), est sans doute à retenir également ici. Le contact entre arcs voisins occasionné par cet œdème doit précéder suffisamment la chondrification pour qu'une réelle fusion puisse se produire.

2. D'autres malformations ne sont repérables à partir du 14<sup>e</sup> jour que par des

perturbations histochimiques (perte d'incorporation dans la zone médiane du centre par exemple). Ce n'est qu'au 18<sup>e</sup> jour qu'elles sont anatomiquement constituées. Dans ce cas, se trouve essentiellement l'ossification bilatérale, accompagnée d'un développement exagéré du *nucleus pulposus*. Citons également les échancrures des centres, comblées par du tissu fibreux. Dans ces deux cas, il n'y a pas régularisation de la forme. Or, l'ossification bilatérale est localisée sur les vertèbres chondrifiées le plus rapidement : c'est vraisemblablement cette différenciation cartilagineuse qui est l'agent inhibiteur du remodelage.

La présence de tissu fibreux au 18<sup>e</sup> jour montre qu'il s'est fait une compensation par les tissus avoisinants, compensation qui a dû s'effectuer entre le 14<sup>e</sup> et le 18<sup>e</sup> jour.

3. Les types suivants, au contraire, sont d'apparition extrêmement tardive, et décelables seulement au terme du développement. Ils possèdent en commun la caractéristique d'opposer à un aspect histologique normal une perte d'activité métabolique et ceci d'une façon localisée. Les activités disparues portent sur des niveaux distincts de la différenciation, la perte du <sup>35</sup>S étant liée à la chondrification, et la perte de phosphatase alcaline à l'ossification. Cette différence est explicable par l'asynchronisme existant entre les zones antérieure et moyenne à 18 jours. On peut supposer que ces deux types de carence sont les aspects successifs d'un même processus. Il est difficile néanmoins d'en juger par la seule observation des fœtus de 17 à 18 jours, mais nous avons déjà évoqué les difficultés que pose la poursuite de l'observation *in vivo* dans la période périnatale. En tout état de cause, ces aspects posent le problème d'une involution de la différenciation.

## CONCLUSION

La première partie de ce travail (NOVEL, 1969) nous avait amené à nous poser la question de l'influence des asynchronismes de développement sur la régionalisation des malformations.

L'étude histologique réalisée ici montre que les différents territoires provertebraux montrent, non pas tant vis-à-vis de l'irradiation elle-même que vis-à-vis de la restauration, des réactions variées. Cette diversité peut être rattachée au fait qu'il y a une cinétique propre à chaque zone dans les processus morphogénétiques se déroulant au moment où cette restauration intervient. Il en résulte que, suivant les régions, c'est un processus plutôt qu'un autre qui est affecté, donc une malformation de nature différente qui apparaît, avec sa morphogénèse propre. C'est ainsi que certaines anomalies sont perceptibles dès le 12<sup>e</sup> jour, alors que d'autres ne se manifestent qu'à la fin du développement embryonnaire. On voit l'intérêt de cette étude chronologique, établissant une correspondance entre la nature des malformations et leur jour d'apparition, pour en comprendre la genèse.

Parmi les problèmes qui restent posés, l'un des plus importants est celui des relations entre l'irradiation et la différenciation. Celle-ci est difficile à évaluer de façon stricte dans le cartilage, en raison de l'hétérogénéité du degré de maturation de ce tissu, et de son manque de constituant qualitativement spécifique.

## SUMMARY

TERATOGENIC EFFECT OF X-RAY IRRADIATION  
ON VERTEBRAL ORGANOGENESIS IN THE MOUSE EMBRYOII. — MORPHOGENESIS OF ABNORMALITIES BETWEEN DAY 10 OF EMBRYONIC LIFE  
AND DAY 18 OF EMBRYONIC LIFE

The current topological and histological study of vertebral development in the Mouse embryo was undertaken in order to explain the shapes and distribution of the abnormalities observed after X-ray irradiation.

The first mechanisms responsible for teratogenesis are pyknosis and temporary cessation of mitosis, which lead to partial destruction of X-ray sensitive areas of skeletal formation. (pictures 7 to 16). Then the morphogenetic movements are slowed down (pictures 17 to 19). A fast resumption of organogenesis follows these phenomena, but the reduction of skeleton can occur whenever the damage was the more important (picture 24). The presence of a physical barrier, e. g. an œdema on the pathway of growing cell clusters can result in distortion, or in fusion of two consecutive elements (fig. 29). In other cases (fig. 21, 22, 23, 25), the elements are twinned.

The latter abnormality occurs only on the part of the vertebral column where chondrogenesis is the fastest, which suggests that the differentiation process started before the morphogenetic movements are achieved. Differentiation therefore appears not to be as much inhibited as morphogenesis. It can however be locally inhibited, as is shown by some involutions (fig. 27, 30, 31) of cell activity, and delayed ossification.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AREY L. B., 1954. *Developmental anatomy*. Saunders, éd., 6<sup>e</sup> éd., 616 p.
- DAWES D., 1930. The development of the vertebral column in Mammals, as illustrated by its development in *Mus musculus*. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, **213**, B, 115-170.
- DEVILLERS Ch., 1954. Structure et évolution de la colonne vertébrale, in *Traité de Zoologie*, P. P. GRASSÉ Masson éd., t. XII, 605-672.
- JOHNSON D. R., 1967. Extra-toes : a new mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse. *J. emb. exper. Morphol.*, **17**, 543-581.
- LASH J., 1963. Tissue interaction and specific metabolic responses : chondrogenic induction and differentiation. In *Cyto-differentiation and macromolecular synthesis*, Locke éd., Acad. Press, 235-270.
- LE DOUARIN G., 1963. Étude de l'action des Rayons X sur la physiologie et l'organogenèse du cœur embryonnaire chez le Poulet. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **97**, 643-759.
- MILAIRE J., 1963. Étude morphologique et cytochimique du développement des membres chez la Souris et chez la Taupe. *Arch. Biol.*, **74**, 129-317.
- NOVEL M., 1969. Étude de la chondrogenèse vertébrale chez l'embryon de souris. Influence d'une irradiation tératogène aux Rayons X. I. Topogenèse des malformations observées au terme du développement. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **9**, 41-54.
- RUSSELL L. B., RUSSELL W. L., 1954. An analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryo. *J. cell. comp. Physiol., suppl.*, **1**, **43**, 103-149.
- SALZGEBER B., 1966. Production élective de la phocomélie sous l'influence d'ypérite azotée, chez l'embryon de Poulet. II. — Étude histologique des bourgeons de membres au cours du développement. *J. emb. exper. Morph.*, **16**, 339-354.
- SKALKO R., 1965. The effect of Co<sup>60</sup> radiation on development and DNA synthesis in the 11 day Rat embryo. *J. exp. Zool.*, **160**, 171-182.
- STRUDEL G., 1962. La genèse de la colonne vertébrale chez l'embryon de Poulet. *87<sup>e</sup> cong. Soc. sav.*, 1199-1216.
- STRUDEL G., 1966. Étude des conséquences d'excisions de somites sur l'organogenèse vertébrale de l'embryon de poulet. *C. R. Acad. Sci.*, **263**, série D, 1604-1607.
- WOLFF Et., 1936. Les bases de la tératogenèse] expérimentale [des vertébrés amniotes d'après les résultats des méthodes directes. *Arch. Anat. Embryol.*, **22**, 1-375.

## PLANCHE I

FIG. 1

Coupe transversale d'un embryon de 10 jours. La fonte dermatomiale est amorcée au centre de cette formation, alors que sa périphérie possède encore une structure épithéliale (flèches). L'allure triangulaire du sclérotome témoigne du mouvement de ses cellules en direction de la corde (ch).  $\times 104$ .

FIG. 2

Coupe tangentielle d'un embryon de 10 jours, montrant la succession des sclérotomites crâniens (cra) et caudaux (cau), et le passage de l'artère intersegmentaire (ai) et du nerf rachidien (n).  $\times 104$ .

FIG. 3

Autoradiographie d'une coupe transversale non colorée d'embryon de 12 jours, montrant la séparation partielle des foyers de chondrogenèse au niveau du centre (flèches) (ch : corde).  $\times 110$ .

FIG. 4

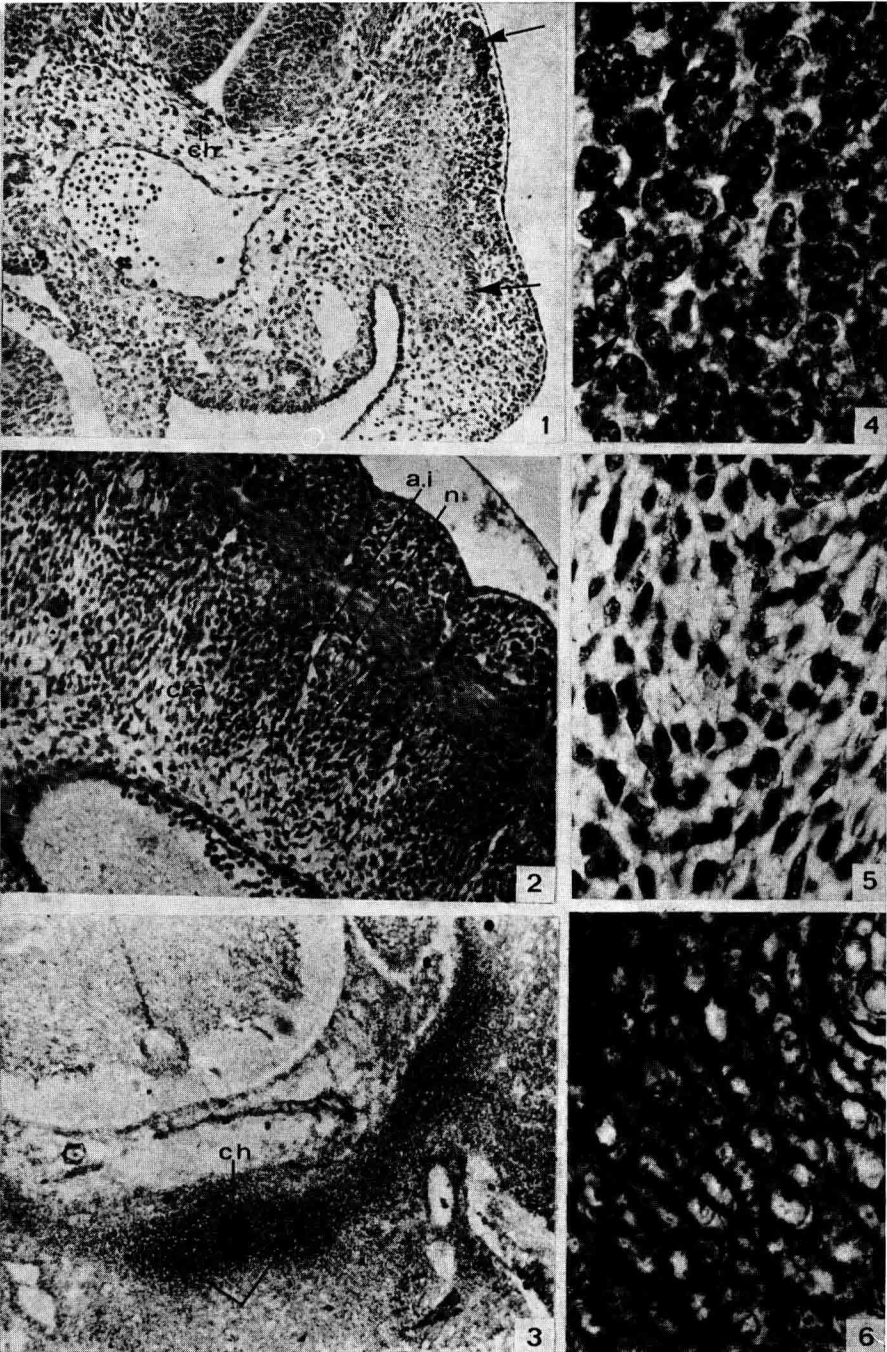
Jeune cartilage de type dense dans le membre d'un embryon de 10 jours et demi ; dans la substance fondamentale apparaissent des paquets de fibres (flèches). Bleu de toluidine.  $\times 610$ .

FIG. 5

Précartilage de type lâche, chez un embryon de 10 jours et demi, dans la zone intervertébrale. On remarque le réseau lâche alcianophile. Alcian-Groat.  $\times 610$ .

FIG. 6

Cartilage hyalin différencié. Vertèbre d'embryon de 12 jours et demi. On remarque les capsules et le début du périchondre.  $\times 960$ .



## PLANCHE II

## FIG. 7 à 10

Coupes de tube neural d'embryons de 10 jours-Feulgen.

## FIG. 7

Dix minutes après l'irradiation, les mitoses se poursuivent sur l'assise épendymiale.  $\times 540$ .

## FIG. 8

Trente minutes après l'irradiation, les mitoses sont totalement stoppées.  $\times 540$ .

## FIG. 9

Trois heures après l'irradiation, les mitoses reprennent (flèches) ; les nécroses affectent toute l'épaisseur du tube neural.  $\times 960$ .

## FIG. 10

Sept heures après l'irradiation, la prolifération de l'assise épendymiale a déjà permis de reconstituer plusieurs assises cellulaires, et a repoussé dans la profondeur du tissu les cellules nécrotiques.  $\times 400$ .

## FIG. 11 à 13

Comportement des dérivés somitiques-Feulgen

## FIG. 11

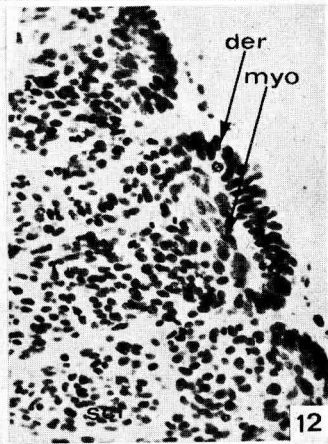
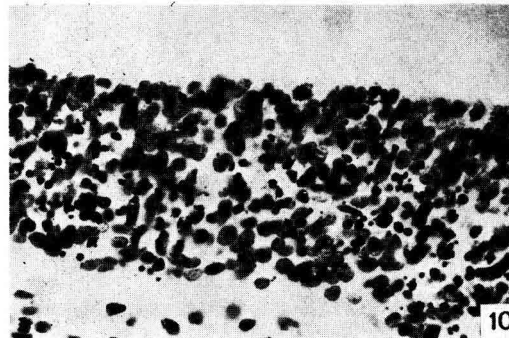
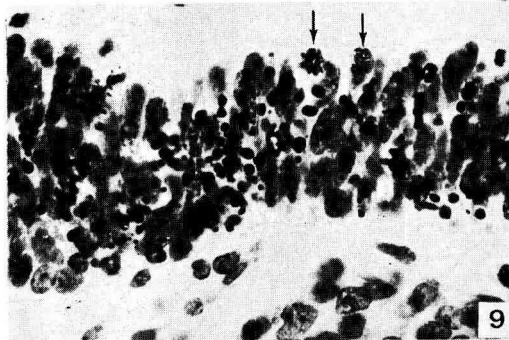
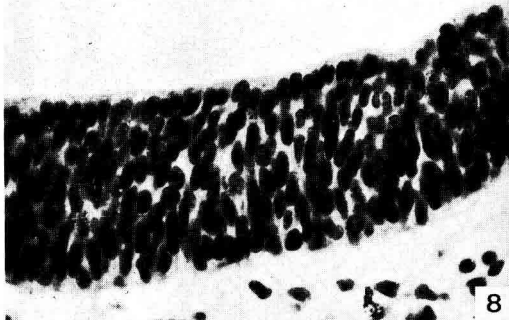
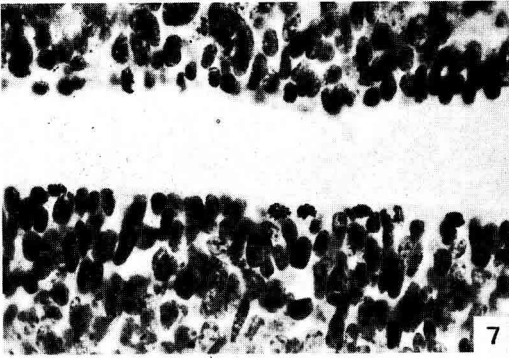
Sept heures après l'irradiation, le dermatome est pycnosé à 80 p. 100, alors que les noyaux allongés du myotome, intacts, montrent quelques divisions (flèche).  $\times 300$ .

## FIG. 12

Témoin âgé de 10 jours. On voit le dermatome, en division active (der) entourant le myotome (myo) reconnaissable à ses noyaux clairs ; l'ensemble surmonte le sclérotome (scl), en division également.  $\times 225$ .

## FIG. 13

Trois heures après l'irradiation, même chose. En outre on peut observer ici le comportement du sclérotome, qui, à côté des nombreuses pycnoses, possède des noyaux en mitoses (flèche).  $\times 225$ .



## PLANCHE III

FIG. 14

Coupe transversale dans la région thoracique, 3 heures après une irradiation. Les nécroses sclérotomiales sont localisées à la base de cette formation. Vert de méthyle-pyronine.  $\times 300$ .

FIG. 15

Sept heures après une irradiation, embryon de 10 jours et demi. Au niveau du centre vertébral, on voit une large zone endommagée. Glychémalum-éosine.  $\times 360$ .

FIG. 16

Même embryon, coupe à un niveau intervertébral. Seule la gaine périchordale est touchée ; le mésenchyme environnant est indemne.

FIG. 17

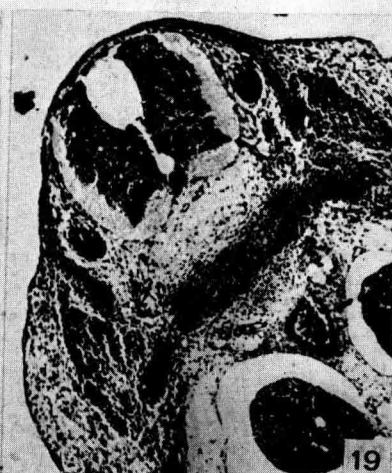
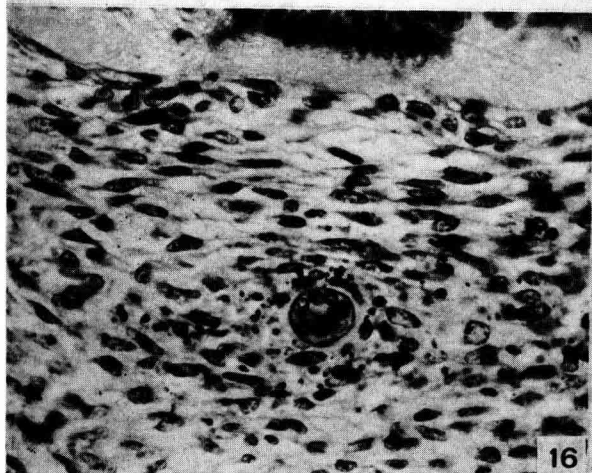
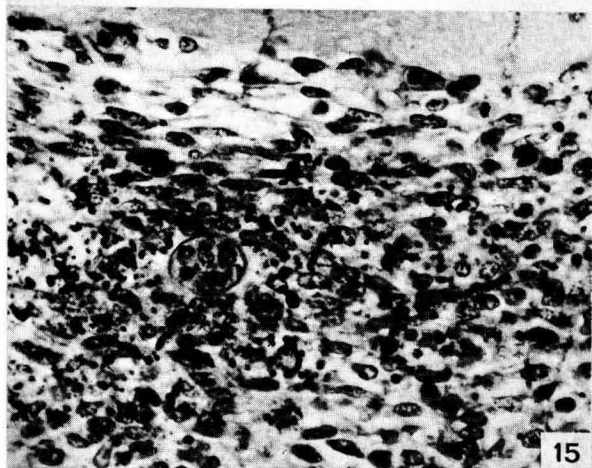
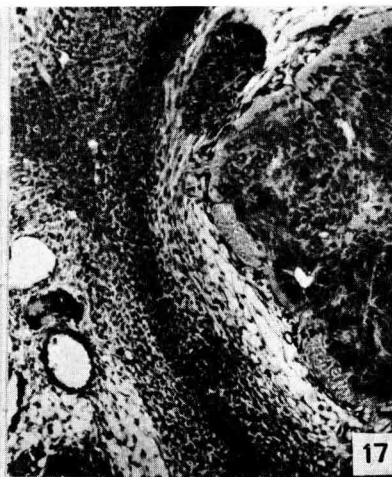
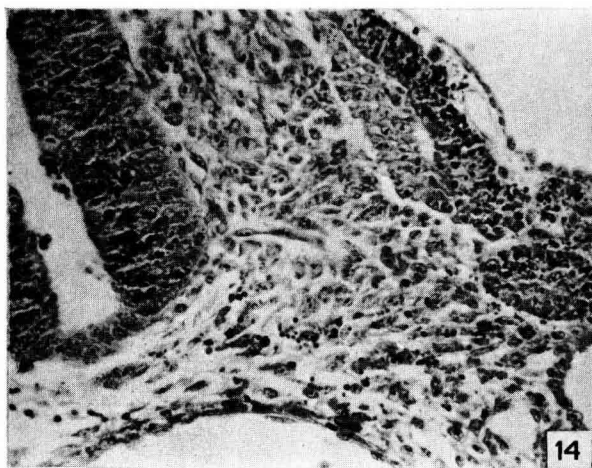
Embryon de onze jours et demi, irradié 36 heures auparavant. Réunion médiane des sclérotomites en un blastème vertébral pré-cartilagineux dense.  $\times 90$ .

FIG. 18

Dans les mêmes conditions, cet autre embryon n'a pas encore réalisé la fusion médiane des sclérotomites au niveau hépatique.  $\times 50$ .

FIG. 19

Embryon de 12 jours. La fusion sclérotomiale est achevée, mais ici la densité cellulaire de la nouvelle ébauche est faible.  $\times 40$ .



## PLANCHE IV

## FIG. 20

Réaction de phosphatase alcaline sur une vertèbre d'embryon témoin de 18 jours.  $\times 50$ .

## FIG. 21-22-23

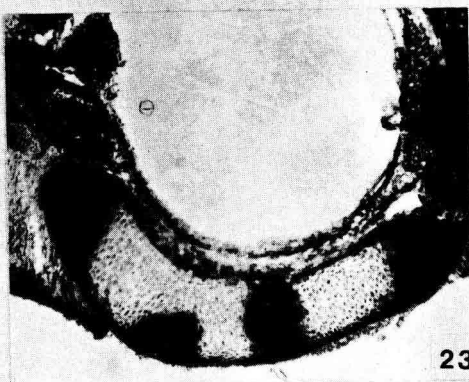
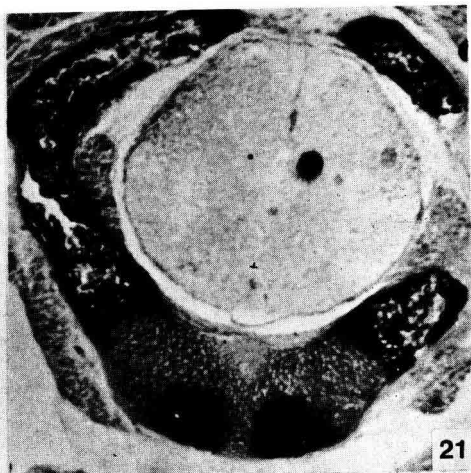
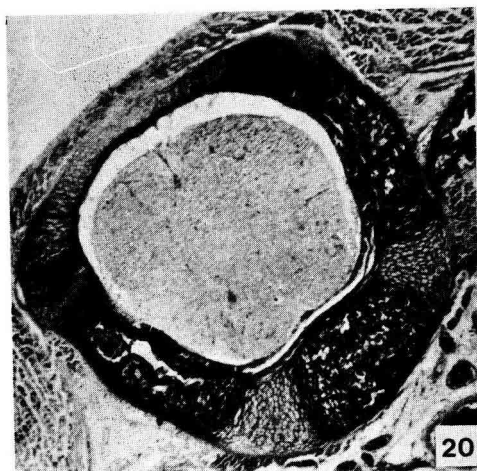
Localisation de la phosphatase alcaline sur des coupes d'embryons irradiés, montrant une scission ou une dispersion des foyers d'ossification au niveau des centres.  $\times 40$  et  $\times 120$ .

## FIG. 24

Développement anormal du *nucleus pulposus*. Hématoxyline.  $\times 117$ .

## FIG. 25

Réduction de la zone de passage entre le centre vertébral et les arcs. Alcian-Groat.  $\times 117$ .



## PLANCHE V

FIG. 26 à 29

Fœtus de 18 jours irradiés à 10 jours

FIG. 26

Apparition de tissu fibreux dans un centre lombaire (flèche). Remarquer l'absence de la portion supradorsale de l'arc neural permettant l'extrusion de la moelle. Alcian-Groat.  $\times 50$ .

FIG. 27

Autoradiographie, montrant une zone ayant perdu son aptitude à incorporer, et pourtant pourvue de capsules métachromatiques (flèche). Bleu de toluidine.  $\times 50$ .

FIG. 28

Autoradiographie d'une vertèbre thoracique, coupe non colorée. La portion ventrale des arcs (v), déjà ossifiée, n'incorpore plus, tandis que la portion dorsale (d) et le centre sont fortement marqués. Noter le développement exagéré du *nucleus pulposus*.  $50 \times$ .

FIG. 29

Fusion costale, avec totale restauration du marquage dans la zone de fusion.  $\times 65$ .

FIG. 30 et 31

Embryons de 14 jours, irradiés à 10 jours.

Autoradiographies sur coupes non colorées. On note des pertes locales d'incorporation (flèches).  $\times 125$ .

