

**DEVELOPPEMENT ET REPRODUCTION
DE PLEURODELES (AMPHIBIENS URODELES)
ECLOS A BORD DE LA STATION SPATIALE MIR ***

**DEVELOPMENT AND REPRODUCTION
OF SALAMANDERS (URODELE AMPHIBIAN)
HATCHED ONBOARD THE MIR SPACE STATION***

Alain BAUTZ, Danielle DURAND, Christiane TANKOSIC,
Anne-Marie BAUTZ, Hervé MEMBRE et Christian DOURNON

Université Henri Poincaré, Nancy 1
EA Génétique, Signalisation, Différenciation
Laboratoire de Biologie expérimentale - Immunologie
Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

RESUME : L'expérience FERTILE a été réalisée à deux reprises à bord de la station orbitale MIR au cours des missions spatiales françaises Cassiopée et Pégase. Le but de l'étude était d'analyser les effets de la micropesanteur sur la fécondation et le développement embryonnaire de l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltl*, puis d'étudier le développement ultérieur après le retour sur terre. Pour cette expérience, un instrument a été développé par le CNES et utilisé pour élever de nombreux œufs, des embryons et des adultes, dans des conditions de micropesanteur, ainsi que pour élever des œufs et des embryons dans une centrifugeuse restituant une gravité de 1G dans l'espace. De nombreux embryons ont été fixés durant le vol orbital, d'autres ont été maintenus vivants pour le

* Note présentée à la séance du 8 mars 2001, acceptée le 19 avril 2001.

retour sur terre. Les jeunes larves qui ont éclos dans l'espace présentent une morphologie et un comportement comparables à ceux des animaux contrôles éclos sur terre. Elevées au laboratoire à température ambiante, elles se sont développées et métamorphosées sans anomalies apparentes, et ont acquis leur maturité sexuelle. Les taux de développement et la morphologie sont analogues chez ces animaux et chez ceux des contrôles au sol élevés à une même période de l'année. Des analyses de descendance ont été réalisées. Des mâles nés dans l'espace ont tout d'abord été croisés avec des femelles du contrôle au sol, puis avec des femelles nées dans l'espace. Les descendance obtenues se développent normalement. Ces résultats montrent clairement que des embryons d'amphibiens nés et ayant séjourné jusqu'à l'éclosion dans l'espace sont capables de vivre et de se reproduire après leur retour sur terre.

Mots clés : Amphibien Urodèle, développement, métamorphose, reproduction, micropesanteur, station MIR.

ABSTRACT : The FERTILE experiment was twice performed onboard the MIR space station during the French Cassiopée and Pégase space missions. The aim of the study was to analyze microgravity effects on the fertilization and embryonic development, and then to study the further development on ground in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. For this experiment, a spatial instrument was developed by the CNES and used to rear numerous eggs, embryos and the adults on trays in μ G conditions, and several eggs and embryos on a 1G-rotating centrifuge. Numerous embryos were fixed during the flight. Some embryos were kept alive after landing. The young larvae with normal morphology and behavior hatched in microgravity as control animals on earth. Recovered on ground at post-hatching stage, young larvae reared at room temperature underwent metamorphosis and became mature without obvious abnormalities. The rate of development and morphology were analogous in these animals and in ground controls reared during a similar annual period. Analysis of offspring was performed. Born-in-space males were firstly mated with ground-control females, and then with born-in-space females. The mating gave progenies that normally developed. Depending on the techniques used and on the limits of the analyses, the works clearly demonstrated that these amphibian embryos born in space are able to live and reproduce after return on earth.

Key words : Urodele Amphibian, development, metamorphosis, reproduction, microgravity, MIR station.

INTRODUCTION

L'expérience FERTILE : "Fécondation et Embryogenèse Réalisées chez le Triton In Vivo dans L'Espace" (BAUTZ et DOURNON, 1995 ; BAUTZ *et al*, 1996a), a été réalisée à deux reprises à bord de la station spatiale MIR. Le but de

l'expérience était de savoir si une fécondation naturelle et un développement embryonnaire normal chez un Vertébré, l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltl*, pourraient se réaliser en micropesanteur, et si le développement ultérieur des sujets éclos dans l'espace pourrait se poursuivre après le retour sur terre jusqu'à l'acquisition de la maturité sexuelle. Les animaux adultes seront-ils alors capables de se reproduire et d'avoir des descendance fertiles ?

De nombreux œufs fécondés et leur développement embryonnaire ont été obtenus dans l'espace. La démonstration que le développement des œufs faisait suite à une véritable fécondation, et non pas à des processus de parthénogenèse ou de gynogenèse possibles chez ces amphibiens, s'appuie sur l'analyse de la distribution des gènes peptidase -1, une enzyme polymorphique liée au sexe, chez les animaux obtenus en micropesanteur et sur l'étude du sexe ratio (AIMAR *et al*, 2000). Des travaux antérieurs avaient montré que la peptidase-1 était un bon marqueur pour déterminer le génotype sexuel des pleurodèles nés dans l'espace (BAUTZ *et al*, 1994 ; BAUTZ *et al*, 1996b). D'autres arguments cytologiques comme la présence de spermatozoïdes dans l'espace périvitellin et la membrane de fécondation des œufs, la présence d'un pronoyau femelle et de plusieurs pronoyaux mâles dans le cytoplasme des œufs confortent la réalité de cette fécondation naturelle (AIMAR *et al*, 2000).

La micropesanteur a des effets sur la cytologie des œufs fécondés. Durant les six premières heures qui précèdent le premier plan de clivage, des altérations de la pigmentation corticale sont observables au niveau de l'hémisphère animal de l'œuf indivis. Les œufs présentent une importante aire non pigmentée autour du point d'entrée des spermatozoïdes, et la migration du pigment cortical vers le pôle animal est significativement amplifiée (AIMAR *et al*, 2000). Des modifications dans la taille, le diamètre et la densité des microvillosités présentes au niveau de l'ébauche du premier plan de clivage du côté pôle animal ont été observées en microscopie électronique à balayage ; en micropesanteur, ces paramètres sont diminués par rapport à ceux des œufs qui se développent au sol en gravité 1G. Des expériences complémentaires faites au laboratoire en conditions d'hypergravité de 2 ou 3G montrent que dans ce cas les microvillosités ont une longueur, un diamètre et une densité plus importantes que les témoins 1G. Les forces gravitationnelles, et plus particulièrement la micropesanteur, influent sur la structure de la surface cellulaire, de la membrane et du cytoplasme cortical, et pourraient agir sur le cytosquelette (AIMAR *et al*, 2000). Des effets ont également été constatés au cours du développement embryonnaire précoce en micropesanteur. L'adhésivité cellulaire est affaiblie durant les phases de segmentation et de neurulation. Bien que le développement précoce ne soit pas strictement normal, suite à des phénomènes de régulation embryonnaire, les embryons aux stades du bourgeon caudal apparaissent morphologiquement normaux et ont pu normalement éclore dans l'espace et présenter un comportement natatoire normal (MEMBRE *et al*, 2000). Le but du présent travail est d'étudier le devenir, après leur retour sur terre, de ces larves nées et écloses dans l'espace.

MATERIEL ET METHODES

1 - Les animaux

Ils sont tous issus des élevages standard du laboratoire. Le Pleurodèle, *Pleurodeles waltl*, est un Amphibien Urodèle Salamandridé. Les stades de développement des embryons et des larves sont déterminés selon la table chronologique de GALLIEN et DUROCHER (1957).

2 - Le protocole de l'expérience FERTILE

Des femelles de Pleurodèle préinséminées au laboratoire ont été embarquées à bord de la station spatiale MIR, soit six femelles pour chacune des deux expériences FERTILE. Elles renfermaient dans leur cloaque des spermatozoïdes vivants qui ont pu féconder les œufs émis lors des ovulations provoquées par un traitement hormonal. Dans la station orbitale MIR, les injections intrapéritonéales de LH-RH ont été pratiquées par le cosmonaute expérimentateur. Les femelles ont répondu en pondant leurs premiers œufs environ un jour plus tard. Les œufs fécondés lors de leur passage dans le cloaque ont été collectés dès leur ponte et distribués en des lots jumeaux d'environ 20 œufs chacun. Ces lots ont été transférés dans l'instrument de biologie spatiale FERTILE développé par le Centre National des Etudes Spatiales (CNES) de l'Agence Française de l'Espace (CHAPUT et BOZOUKLIAN, 1994 ; BAUTZ *et al*, 1996a ; GUALANDRIS-PARISOT *et al*, 1998 ; HUSSON *et al*, 2001). Les premiers lots ont été placés sur des clayettes en micropesanteur, les seconds dans une centrifugeuse recréant une gravité de 1G dans la station MIR. Les œufs se sont développés à la température de 18°C. La plupart des œufs et des embryons ont été fixés à différents stades du développement pour des observations ultérieures au laboratoire. D'autres ont été maintenus vivants pour un retour sur terre. Des expériences contrôles, synchrones des expériences vol, ont été menées au sol.

3 - Les missions spatiales

L'expérience FERTILE s'est déroulée deux fois à bord de la station MIR lors des missions spatiales françaises Cassiopée (du 17 août au 2 septembre 1996) et Pégase (du 29 janvier au 19 février 1998). Les cosmonautes français, le Docteur Claudie André-Deshays et le Lieutenant-Colonel Léopold Eyhartz ont respectivement pris en charge l'expérience au cours de ces deux missions. Certains résultats obtenus durant ces deux missions, ont été partiellement complétés dans le cadre de l'expérience Genesis lors de la mission spatiale de longue durée Perseus (1999), avec le Général Jean-Pierre Haigneré comme cosmonaute expérimentateur.

RESULTATS

1 - Nombres de larves vivantes récupérées au retour sur terre.

A bord de la station MIR, 10 des 12 femelles des vols Cassiopée et Pégase ont pondu des œufs fécondés qui ont pu se développer soit en micropesanteur ambiante, soit en 1G dans la centrifugeuse. Sur les 12 femelles du contrôle synchrone au sol, 11 ont pondu des œufs. Les pourcentages de développement calculés pour les deux missions ont été définis comme étant le nombre d'embryons ayant atteint au moins le stade 2 blastomères, c'est à dire ayant dépassé la première division de segmentation, sur le nombre total d'œufs pondus (Fig.1). Beaucoup d'embryons ont été fixés à différents stades du développement au cours de leur séjour orbital pour des études morphologiques, histologiques, immunocytologiques ou ultrastructurales à réaliser au laboratoire après le retour sur terre. Les larves vivantes récupérées au sol ont effectué l'ensemble de leur développement embryonnaire et leur éclosion en environnement spatial. Elles présentaient un comportement natatoire comparable à celui des larves témoins au sol. Le nombre de larves récupérées vivantes après l'atterrissage et celui des larves qui se sont développées jusqu'à l'âge adulte sont rapportés dans la figure 1.

	nombre total d'œufs pondus	% d'embryons	nombre de larves vivantes	nombre d'adultes reproducteurs
Mission Cassiopée :				
- à bord de MIR				
en micropesanteur	504	21%	22	13
en centrifugeuse 1G	147	13%	3	3
- au sol				
en gravité 1G	527	23%	0	
Mission Pégase :				
- à bord de MIR				
en micropesanteur	719	82%	29	13
en centrifugeuse 1G	173	87%	0	
- au sol				
en gravité 1G	680	78%	66	12

Figure 1 : Nombre d'œufs pondus par les femelles à bord de la station MIR ou au laboratoire, pourcentage de développement embryonnaire obtenu, nombre de larves écloses vivantes au moment du retour sur terre, nombre d'adultes reproducteurs.

La durée du développement embryonnaire depuis le moment de la ponte (stade 0) jusqu'aux stades de l'éclosion (stades 34, 35, 36) est la même pour les animaux élevés à 18°C à bord de la station MIR ou à terre au laboratoire.

2 - Développement larvaire et métamorphose

Après le retour des larves vivantes au laboratoire, le développement postembryonnaire jusqu'à l'achèvement de la métamorphose (stades 35 à 56) des animaux éclos en micropesanteur ou dans la centrifugeuse 1G au cours du vol spatial a été similaire à celui des larves contrôles au sol. Aucune anomalie de croissance n'a été observée. Le développement en durée et en taille de ces larves nées dans l'espace est comparable à celui des progénitures pondues naturellement avant la mission spatiale par les mêmes femelles sélectionnées pour l'espace et à celui des femelles contrôles au sol dont la ponte a été provoquée par une injection d'hormone (Fig. 2 et Fig. 3). Ces vitesses de développement sont conformes à celles des animaux standard élevés au laboratoire durant des périodes annuelles correspondantes.

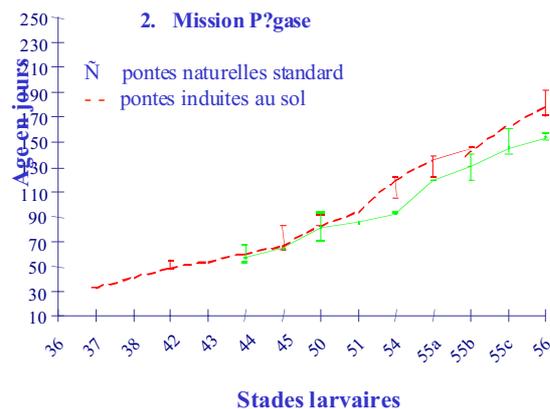


Figure 2 : comparaison des durées du développement larvaire pour les descendances provenant de la ponte naturelle des femelles sélectionnées avant la mission Pégase et de la ponte provoquée des mêmes femelles utilisées pour les expériences contrôles au sol.

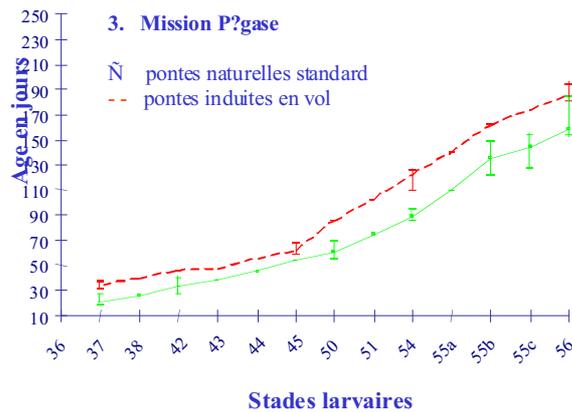


Figure 3 : comparaison des durées du développement larvaire pour les descendance provenant de la ponte naturelle des femelles sélectionnées avant la mission Pégase et de la ponte provoquée des mêmes femelles au cours du vol Pégase.

3 - Développement juvénile et maturité sexuelle des animaux nés dans l'espace

Après la métamorphose, marquée morphologiquement par la régression totale des branchies externes et de la nageoire dorso-caudale, les animaux ont continué à grandir sans aucune anomalies apparentes. Entre 11 et 12 mois après l'atterrissage, les mâles présentaient des callosités brachiales et des lèvres cloacales turgescentes, signes de leur maturité sexuelle. Entre 14 et 16 mois, les autres animaux ont acquis le phénotype femelle. Le phénotype sexuel des animaux contrôles au sol s'est exprimé dans les mêmes délais.

Ces animaux matures possèdent un phénotype sexuel en accord avec leur génotype sexuel diagnostiqué par les tests peptidase-1 réalisés au cours de leur développement larvaire (AIMAR *et al*, 2000).

4 - Analyse des descendance de première génération de Pleurodèles nés dans l'espace

Sept mâles nés en micropesanteur ont tout d'abord été croisés avec 9 femelles standard du laboratoire. Quatre de ces femelles seulement ont pondu des œufs fécondés. Dans un deuxième temps, 3 de ces 7 mâles ont été croisés avec 3 femelles nées dans l'espace. Les 3 femelles ont pondu des œufs fécondés. Dans un troisième temps, un de ces 3 mâles a été croisé avec une femelle née en micropesanteur mais développée jusqu'à l'éclosion dans la centrifugeuse 1G à

bord de MIR. La femelle a pondu des œufs fécondés. D'autres croisements ont été réalisés, mais sans succès. Pour toute les descendance de première génération (F1), le pourcentage de fécondation (nombre d'embryons au stade 2 cellules / nombre d'œufs pondus) et le pourcentage de développement (nombre d'embryons au stade du bourgeon caudal / nombre d'œufs pondus) sont en accord avec ceux classiquement obtenus chez les descendance standard du laboratoire (Fig. 4).

croisement entre :					nombre d'œufs pondus	% d'œufs fécondés	% d'œufs développés	% d'embryons anormaux
femelles nées dans l'espace		mâles nés dans l'espace	femelles standard sol	mâles standard sol				
1G	μG	μG	1G	1G				
A	F	B	a		453	92	87	1
		C	b		4	100	100	0
		C	b		647	92	91	2
		C			604	86	85	2
	G	C			871	91	89	27*
		D	c		997	93	90	1
		D			399	86	82	<1
		E	d		201	87	79	<1
H	E			546	93	93	<1	
			Sd 1	Sd a	279	89	87	<1
			Sd 2	Sd b	348	95	92	<1
			Sd 3	Sd c	199	93	91	<1
			Sd 4	Sd d	703	98	97	<1
			Sd 5	Sd e	1634	96	95	<1
			Sd 6	Sd e	425	91	89	<1
			Sd 6	Sd f	961	92	91	<1
			Sd 7	Sd g	1426	97	96	1
			Sd 8	Sd h	165	88	87	1
			Sd 9	Sd i	793	98	97	18**
			Sd 10	Sd j				<1

Figure 4 : résultats des croisements de première génération effectués entre des animaux nés et développés jusqu'à l'éclosion à bord de MIR pendant la mission Cassiopée et des animaux contrôles du sol, ou entre deux animaux issus du vol orbital. * : anomalies exprimées durant les stades de segmentation et observées également dans les pontes standard de la même femelle. ** : anomalies exprimées durant les stades du bourgeon caudal. Sd : animal standard. A, B,..., a, b,..., Sd 1, Sd 2,..., Sd a, Sdb,... : référence de l'animal croisé.

CONCLUSION

En tenant compte des méthodes utilisées et des limites des analyses pratiquées dans ces expériences de biologie spatiale, les résultats indiquent clairement que les effets de la micropesanteur constatés sur les processus de la fécondation et les stades précoces de l'embryogenèse (AIMAR *et al*, 2000) n'ont pas d'incidence majeure, suite à des phénomènes de régulation embryonnaire, sur la vie et le développement ultérieur après le retour sur terre de l'Amphibien *Pleurodeles waltl*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le Poisson *Orizias latipes* par IJIRI (1995, 1997). Le développement des premières descendances d'animaux nés et éclos dans l'espace sont sans différences apparentes avec les descendances des animaux standard du laboratoire (DOURNON *et al*, 2001). Des croisements de deuxième génération entre des individus nés de parents éclos dans l'espace sont actuellement en cours d'analyse.

REFERENCES

- AIMAR C., BAUTZ A., DURAND D., MEMBRE H., CHARDARD D., GUALANDRIS-PARISOT L., HUSSON D. and DOURNON C., 2000 - Microgravity and hypergravity effects on fertilization of the salamander *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian). *Biol. Reprod.*, **63**, 551-558.
- BAUTZ A., RUDOLF E., AIMAR C., MITASHOV V., HOUILLON C. et DOURNON C., 1994 - Expression d'une protéine liée au sexe, la peptidase-1, chez des Pleurodèles femelles soumises à un vol orbital et recherche d'anomalies génétiques dans leurs descendances. *Bull. Acad. Soc. Lorr. Sci.*, **33**, 149-158.
- BAUTZ A. et DOURNON C., 1995 - L'animal dans l'espace. De la préparation des vols habités à l'acquisition de connaissances fondamentales en biologie gravitationnelle. Les projets "Torcol" et "Fertile". *Bull. Acad. Soc. Lorr. Sci.*, **34**, 3-15
- BAUTZ A., DURAND D., OUKDA M., TANKOSIC C. et DOURNON C., 1996a - Les missions spatiales 1995 et 1996 du Laboratoire de Biologie expérimentale-Immunologie de l'Université Henri Poincaré de Nancy. *Bull. Acad. Soc. Lorr. Sci.*, **35**, 195-201.
- BAUTZ A., RUDOLF E., MITASHOV V. and DOURNON C., 1996b - Peptidase-1 expression in some organs of the salamander *Pleurodeles waltl* submitted to a 12-day space flight. *Adv. Space Res.*, **17**, 271-274.
- CHAPUT D. and BOZOUKLIAN H., 1994 - FERTILE : an instrument to study development processes of amphibian in microgravity. *IAF-94-G.2.138*, 1-6.

- DOURNON C., RUDOLF E., BAUTZ A., AIMAR C., MITASHOV V. and HOUILLON C., 1994 - "Experience Triton" on Bion 10 : study of peptidase-1 expression in embarked *Pleurodeles* females and détection of genetic abnormalities in their progeny. *ESA*, **SP-366**, 171-175.
- DOURNON C., DURAND D., TANKOSIC C., MEMBRE H., GUALANDRIS-PARISOT L. and BAUTZ A., 2001 - Further larval development, metamorphosis and reproduction of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) born and developed up to hatching stage in microgravity. *Develop. Growth Differ.*, **43**, in press.
- GALLIEN L. et DUROCHER M., 1957 - Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **91**, 97-114.
- GUALANDRIS-PARISOT L., BAUTZ A., CHAPUT D., HUSSON D., DURAND D. et DOURNON C., 1998 - Mises au point technologiques en vue d'étudier le développement du Pleurodèle (Amphibien Urodèle) à bord de la station spatiale MIR. *Récents progrès en Génie des Procédés*, Lavoisier Ed. Paris, **12**, 37-48.
- HUSSON D., CHAPUT D., BAUTZ A., DAVET J., DURAND D., DOURNON C. and GUALANDRIS-PARISOT L., 2001 - Design of specific hardware to obtain embryos and maintain adults urodele amphibians aboard a space station. *Adv. Space Res.*, in press.
- IJIRI K., 1995 - The first vertebrate mating in space - a fish story. *Ricut Ed., Tokyo*, 57 p.
- IJIRI K., 1997 - Explanations for a video version of the first vertebrate mating in space - a fish story. *Biol. Sci. in Space*, **11**, 153-167.
- MEMBRE H., BAUTZ A., DURAND D., AIMAR C., BAUTZ A.M. and DOURNON C., 2000 - Microgravity effects on fertilized eggs have no incidence, after landing, on the further larval development and reproduction in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Gravitational and Space Biology Bulletin*, **14**, p.28.