

**ROLE PRESUME DE LA GRAVITE DANS LA  
SYMETRISATION DE L'EMBRYON DES  
AMPHIBIENS. REPONSE APPOREE PAR  
L'EXPERIMENTATION EN BIOLOGIE DANS  
L'ESPACE.**

**PRESUMED ROLE OF THE GRAVITY IN THE  
ESTABLISHMENT OF THE SYMMETRIZATION IN  
AMPHIBIAN EMBRYOS. RESPONSE PROVIDED BY THE  
BIOLOGICAL EXPERIMENTATION IN SPACE.**

**Alain BAUTZ**

Laboratoire de Biologie expérimentale - Immunologie  
Université Henri Poincaré, Nancy 1, Faculté des Sciences et Techniques  
BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

**RESUME**

Au cours du développement embryonnaire précoce des Amphibiens, plusieurs événements ont été décrits comme pouvant être dépendants de la gravité terrestre : la rotation d'équilibration de l'œuf, la migration du pronoyau femelle, la symétrisation bilatérale de l'individu, l'orientation des premiers plans de clivages. Cette idée de dépendance, émise depuis plus d'un siècle, relevait uniquement d'observations et d'expériences réalisées sur Terre, en présence de la gravité 1G. L'accès à des périodes de micropesanteur de longue durée, au cours de vol orbitaux sur la station spatiale Mir, a permis de montrer que chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltl*, un développement embryonnaire complet et l'éclosion de larves morphologiquement normales peuvent être obtenus en l'absence de la gravité terrestre. Tous les embryons développés en micropesanteur présentent une symétrie bilatérale normale. La rotation d'équilibration de l'œuf, qui se réalise sur terre après la fécondation, n'est pas nécessaire chez les Urodèles pour la détermination du plan de symétrie bilatérale. Les résultats obtenus chez le Pleurodèle sont en accord avec ceux observés précédemment chez l'Anoure *Xenopus laevis* et le Poisson *Oryzias latipes*.

**Mots clés** : Amphibiens, embryogenèse, micropesanteur, expérience FERTILE

---

Note présentée à la séance du 16 mai 2002, acceptée le 6 juin 2002.

## SUMMARY

During the early embryonic development of the amphibian, several events are presumed to be dependent on the ground gravity (egg rotation of equilibrium, formation of the grey crescent, symmetrization, cleavage). Will development occur normally in the absence of the gravity ? The experience FERTILE had led to obtain in weightlessness, onboard the space station Mir, the natural fertilization and the embryonic development of the salamander *Pleurodeles waltl*, an amphibian urodele. All the embryos developed in microgravity acquired normal bilateral symmetry. The egg rotation that occurs on earth after fertilization is clearly not necessary in urodeles to determine the position of symmetrical plan. The results obtained in *P. waltl* are in accordance with those observed earlier in the anuran *Xenopus laevis* and the fish *Oryzias latipes*.

**Key words :** Amphibians, embryogenesis, microgravity, FERTILE experiment

## INTRODUCTION

Depuis la formation de la Terre, la gravité a été un facteur constant de l'environnement, et dès l'apparition de la vie sur la planète, le développement des organismes s'est réalisé en gravité 1G. A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, les embryologistes ont commencé à spéculer sur le rôle de la gravité au cours de l'ontogenèse, et sur l'idée que certaines espèces animales pourraient même requérir la gravité pour réaliser un développement normal.

Au cours du développement embryonnaire précoce des Amphibiens, plusieurs processus ont été décrits comme pouvant être dépendants de la gravité terrestre. Mais le rôle de la gravité dans le développement des embryons n'a jamais pu être prouvée, car il n'existait aucune technique au sol permettant de supprimer la gravité terrestre pendant plusieurs jours, ni même plusieurs heures. Il fallait nécessairement accéder à l'espace (RAHMANN et SLENZKA, 1994). Parmi ces processus, on peut citer :

- **la rotation d'équilibration de l'oeuf.** Au moment de la ponte, les œufs, dont le centre de gravité est excentré, sont émis dans l'eau sans orientation préférentielle. Au cours des phénomènes de fécondation, sous l'effet de la gravité, l'œuf sphérique, tourne dans ses enveloppes et s'oriente. L'hémisphère végétatif, alourdi par le vitellus abondant, se positionne vers le bas, l'hémisphère animal, pigmenté en brun foncé ou en noir, moins riche en vitellus, vers le haut.

- **la migration du pronoyau femelle.** Après la pénétration du spermatozoïde, le pronoyau femelle, initialement localisé près du pôle animal, descend à la verticale suivant l'axe pôle animal - pôle végétatif à la rencontre du pronoyau mâle.

- **la symétrisation de l'embryon.** Chez les Anoures, suite à l'impact spermatique et avant l'apparition du premier plan de clivage, la région corticale pigmentée du cytoplasme de l'hémisphère animal bascule de 30° en direction du point d'impact spermatique. Ce basculement laisse apparaître derrière lui dans le cytoplasme une traînée peu pigmentée en forme de croissant, c'est le croissant dépigmenté ou croissant gris. Celui-ci permet de visualiser la position du plan de symétrie

bilatérale du futur embryon ; elle correspond au plan de symétrie du croissant dépigmenté. Ce croissant indique en outre la région dorsale du futur embryon. A ce niveau apparaît, en début de gastrulation, la lèvre dorsale du blastopore. A l'acquisition de la symétrie bilatérale externe, mise en évidence par les déplacements pigmentaires de l'hémisphère animal, se superpose l'acquisition de la symétrie interne soulignée par des déplacements de compartiments cytoplasmiques (UBBELS, 1977).

- **l'orientation des premiers plans de clivage de l'œuf.** Les deux premiers plans sont verticaux et perpendiculaires l'un à l'autre. Ils débent au pôle animal et progressent vers le pôle végétatif. Le premier plan coïncide généralement avec le plan de symétrie bilatérale de l'individu. Le troisième plan de division est horizontal, plus proche du pôle animal que du pôle végétatif. L'embryon est alors constitué de 8 cellules de taille inégale, 4 micromères animaux et 4 macromères végétatifs.

## **ARGUMENTS EXPERIMENTAUX EN FAVEUR D'UN ROLE DE LA GRAVITE**

Différents travaux expérimentaux déjà anciens plaident en faveur d'un rôle de la gravité dans les processus de développement embryonnaire précoce et de symétrisation de l'individu chez les Amphibiens. On peut rappeler ici quelques exemples :

### **- expériences perturbant l'orientation normale des œufs.**

SCHULTZE (1894) retourne de 180° des œufs indivis, prélevés un peu avant le moment de leur première division, par conséquent après leur symétrisation. Il place leur pôle végétatif vers le haut. Les œufs, emprisonnés entre deux lames de verre, ne peuvent pas se retourner. Le renversement complet de l'œuf entraîne un remaniement des divers constituants cytoplasmiques. Le vitellus abondant de l'hémisphère végétatif retombe par mottes sous l'effet de la pesanteur. Un gradient vitellin se reconstitue en sens inverse du gradient d'origine. Dans 50% des cas de développement, les jeunes gastrules présentent deux lèvres blastoporales dorsales au lieu d'une. Dans ces cas, il obtient une duplication partielle de la région antérieure des embryons.

PASTEELS (1938, 1940a, 1941) ne retourne pas complètement les œufs. Il leur donne des orientations diverses ne dépassant pas 135°. Le vitellus glisse lentement, descend en masse. La lèvre blastoporale dorsale apparaît près du centre du croissant dépigmenté. Les développements obtenus sont normaux.

ANCEL et VINTEMBERGER (1948) montrent chez *Rana temporaria* que si l'œuf indivis est retourné de 180° ou suffisamment incliné très tôt, et à condition qu'il puisse se réorienter, le plan de symétrie bilatérale correspond au plan de cette rotation d'orientation. Le croissant apparaît toujours du côté descendant. La gravité prévaut alors sur l'impact spermatique.

### **- expériences de centrifugation.**

PASTEELS (1940b) soumet à une centrifugation de 460G pendant 2 à 3 minutes des œufs indivis, juste avant la formation du croissant dépigmenté.

L'hypergravité entraîne une modification du gradient vitellin. La lèvre blastoporale apparaît plus dorsalement que la normale. Il obtient des embryons microcéphales.

Plus récemment, GERHART *et al* (1983), après une centrifugation à 30G durant 4 minutes d'œufs indivis de *Xenopus laevis*, obtiennent des neurules présentant un dédoublement partiel du plan de symétrie et des larves bicéphales. Dans leurs expériences, l'action de l'hypergravité s'exerce perpendiculairement à l'axe pôle animal - pôle végétatif des œufs.

#### - expériences en micropesanteur de courte durée.

UBBELS (1988, 1991) lors du vol balistique de la fusée-sonde Texas 17, BAUTZ *et al* (1992) au cours de vols paraboliques d'avion, réalisent respectivement chez le Xénope (Anoure) et le Pleurodèle (Urodèle) des fécondations artificielles. De retour au sol, le développement de ces œufs conduit à l'obtention d'embryons normaux et anormaux, dont des bicéphales. Dans ces vols de courte durée, les conditions de gravité dégradée sont très hétérogènes, des phases d'hypergravité liées aux accélérations alternent avec les phases de micropesanteur de quelques secondes à quelques minutes maximum.

Il était donc nécessaire de pouvoir réaliser au cours de vol orbitaux de plus longue durée, des expériences permettant d'obtenir à la fois des fécondations naturelles et des développement embryonnaires complets en micropesanteur.

### APPORTS DE L'EXPERIENCE FERTILE

L'expérience FERTILE ("Fécondation et Embryogenèse Réalisées chez le Triton In Vivo dans L'Espace", BAUTZ et DOURNON, 1995 ; BAUTZ *et al*, 1996) a été réalisée à bord de la Station orbitale Mir, au cours de deux missions spatiales franco-russes, les missions Cassiopée en août 1996 et Pégase en février 1998. Le but de l'expérience était de savoir si la fécondation naturelle et le développement embryonnaire normal d'un Vertébré, l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltl*, pouvaient se réaliser en micropesanteur (GUALANDRIS-PARISOT *et al*, 1994). Pour chaque mission, six femelles préinséminées au laboratoire sur terre ont été embarquées à bord de la station orbitale Mir. La ponte des ovocytes a été déclenchée en début de vol orbital par une injection d'hormone LH-RH pratiquée par le cosmonaute responsable du suivi de l'expérience dans la station. Les femelles ont répondu en pondant leurs premiers œufs environ 24 heures plus tard. La fécondation des œufs a pu se faire lors de leur passage dans le cloaque renfermant des spermatozoïdes vivants stockés.

Dix des 12 femelles envoyées dans l'espace ont pondu de nombreux œufs fécondés qui ont pu se développer, après transfert dans l'instrument de biologie spatiale FERTILE (GUALANDRIS-PARISOT *et al*, 1998 ; HUSSON *et al*, 2001), soit en micropesanteur ambiante, soit dans une centrifugeuse recréant une gravité 1G dans la station Mir. Sur les 12 femelles des contrôles synchrones 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). Les pourcentages de développement embryonnaire dans Mir et sur Terre

sont comparables. De nombreux embryons ont été fixés durant le vol orbital à différents stades du développement embryonnaire, d'autres ont été maintenus vivants jusqu'à l'éclosion et ont pu être récupérés après le retour sur Terre.

	nombre total d'œufs pondus	% d'embryons
<b>Mission Cassiopée :</b>		
<u>à bord de Mir</u>		
en micropesanteur	504	21,4 %
en centrifugeuse 1G	147	12,9 %
<u>au sol, gravité 1G</u>	527	22,8 %
<b>Mission Pégase :</b>		
<u>à bord de Mir</u>		
en micropesanteur	719	82,4 %
en centrifugeuse 1G	173	86,7 %
<u>au sol, gravité 1G</u>	680	77,6 %
<b>total missions :</b>		
<u>à bord de Mir</u>		
en micropesanteur	1123	57,2 %
en centrifugeuse 1G	320	52,8 %
<u>au sol, gravité 1G</u>	1207	53,7 %

Figure 1 : Nombre d'œufs pondus par les femelles à bord de la station Mir, par les femelles contrôles sur terre, et pourcentage de développement embryonnaire obtenu.

## DISCUSSION

L'expérience FERTILE a permis d'obtenir dans un environnement de micropesanteur, le développement de nombreux embryons de Pleurodèle. Ce résultat montre que la rotation d'équilibration, qui ne peut pas se réaliser en l'absence de la gravité, n'est pas nécessaire au bon développement de l'œuf.

Bien que les premières phases du développement de l'œuf ne soient pas strictement normales sur le plan cytologique (AIMAR *et al*, 2000), malgré quelques segmentations asymétriques (GUALANDRIS-PARISOT *et al*, 2002), tous les embryons acquièrent une symétrie bilatérale apparemment normale. La rotation de l'œuf fécondé n'est pas nécessaire pour la détermination de la position du plan de symétrie bilatérale. Suite à des phénomènes de régulation embryonnaire, les embryons au stade du bourgeon caudal apparaissent morphologiquement normaux, et les jeunes larves qui ont éclos dans l'espace présentent un comportement natatoire comparable à celui d'animaux témoins sur Terre. Leur développement ultérieur après retour sur Terre est similaire à celui des animaux témoins (DOURNON *et al*, 2001 ; BAUTZ *et al*, 2001).

Ces résultats sur la fécondation et le développement embryonnaire du Pleurodèle en micropesanteur confortent ceux obtenus chez le Poisson *Orizias latipes*. Des couples de Medaka ont pu se reproduire dans l'espace. Les

développements embryonnaires obtenus sont normaux. La gravité n'est pas nécessaire pour la mise en place du plan de symétrie bilatérale (IJIRI, 1995, 1997).

Nos résultats complètent également les données obtenues chez d'autres modèles d'Amphibiens. UBBELS *et al* (1989) ont obtenu pour la première fois en micropesanteur de courte durée (6 min. 43 sec. ) à bord d'une fusée-sonde, une fécondation artificielle chez *Xenopus laevis* (Anoure). Avec le même protocole expérimental automatique, mais à bord de la navette spatiale américaine permettant une période de microgravité plus longue de plusieurs jours, ils obtiennent des stades de développement plus âgés, des blastules et des gastrules présentant un toit du blastocoele anormalement épaissi. Dans la suite du développement, les embryons présentent une symétrie bilatérale correcte (UBBELS *et al*, 1994).

SOUZA et son équipe ont réalisés eux aussi des fécondations artificielles chez le Xénope lors d'un vol de la navette américaine en septembre 1992. La ponte ovocytaire des femelles embarquées a été induite par une injection d'hormone en début de vol orbital. Les ovocytes ont été fécondés *in vitro* avec des spermatozoïdes préparés au sol avant le décollage. Les œufs fécondés ont été répartis en deux lots, en micropesanteur et en centrifugeuse 1G. Compte tenu de la durée du séjour orbital (9 jours), le développement des œufs a pu commencer en micropesanteur. Parmi les embryons de stades très précoces, peu sont normaux. Au stade 2 cellules, le premier plan de segmentation est normal, mais l'aster mitotique est plus bas, plus proche du pôle végétatif, que chez les témoins. Le toit du blastocoele des jeunes gastrules est plus épais que la normale et la cavité de segmentation déportée vers le pôle végétatif (BLACK *et al*, 1996). Mais il est difficile de dire si les anomalies observées sont dues aux conséquences de la fécondation artificielle (anomalies caryotypiques) ou si elle sont dues aux contraintes du vol spatial. Les neurules fixées dans l'espace et les jeunes larves vivantes récupérées au moment du retour sur Terre apparaissaient morphologiquement normales, probablement suite à des processus de régulation embryonnaire (SOUZA *et al*, 1995).

Nos résultats confortent aussi ceux acquis chez le Triton japonais, *Cynops pyrrhogaster*, un Amphibien Urodèle. Les expériences ont pu être réalisées lors de vols sur la navette américaine en 1994, 1995, 1996. Les femelles avaient été préinséminées au sol avant le décollage. La ponte ovocytaire a été provoquée au début du vol par une injection automatique d'hormone, les ovocytes étant fécondés de façon naturelle au passage dans le cloaque. A partir de l'examen d'images vidéo prises au cours du vol orbital, les 71 embryons obtenus ont été jugés normaux (MOGAMI *et al*, 1996 ; YAMASHUTA *et al*, 2001).

En conclusion, les résultats obtenus chez le Pleurodèle confirment que la micropesanteur a des effets pendant la phase embryonnaire précoce, et particulièrement au cours de la segmentation et de la neurulation. Bien que le développement précoce ne soit pas strictement normal, suite à des phénomènes de régulation embryonnaire, les jeunes larves à l'éclosion présentent un aspect morphologique et un comportement natatoire normaux. Les processus gravi-dépendants observés lors du développement sur Terre, processus qui ne peuvent

pas se réaliser en environnement de micropesanteur, ne sont pas nécessaires à la mise en place du plan de symétrie bilatérale des embryons.

## BIBLIOGRAPHIE

- AIMAR C., BAUTZ A., DURAND D., MEMBRE H., CHARDARD D., GUALANDRIS-PARISOT L., HUSSON D., DOURNON C., 2000 - Microgravity and hypergravity effects on fertilization of the salamander *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian). *Biol. Reprod.*, **63**, 551-558.
- ANCEL P., VINTEMBERGER P., 1948 - Recherches sur le déterminisme de la symétrie bilatérale dans l'œuf des Amphibiens. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, suppl. **31**, 1-182.
- BAUTZ A., GRINFELD S., HOUILLON C., DUPRAT A.M., DOURNON C., 1992 - Intérêt des vols paraboliques d'avion pour l'étude de l'influence de la microgravité et de l'hypergravité sur la fécondation et le développement de *Pleurodeles waltl* (Amphibien Urodèle). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **117**, 168-169.
- BAUTZ A., 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., DOURNON C., 1996 - 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., DURAND D., TANKOSIC C., BAUTZ A-M., MEMBRE H., DOURNON C., 2001 - Développement et reproduction de Pleurodèles (Amphibiens Urodèles) éclos à bord de la station spatiale Mir. *Bull. Acad. Lorr. Sci.*, **40**, 37-46.
- BLACK S., LARKIN K., JACQMOTTE N., WASSERSUG R., PRONYCH S., SOUZA K., 1996 - Regulative development of *Xenopus laevis* in microgravity. *Adv. Space Res.*, **17**, 209-217.
- DOURNON C., DURAND D., TANKOSIC C., MEMBRE H., GUALANDRIS-PARISOT L., BAUTZ A., 2001 - Effects of microgravity on the larval development, metamorphosis and reproduction of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Develop. Growth Differ.*, **43**, 315-326.
- GERHARDT J., BLACK S.D., GIMLICH R., CSHART S., 1983 - Control of polarity in the amphibian egg. *Time, Space and Pattern in embryonic Development*, Alan R. Liss, Inc., New-York, 261-286.
- GUALANDRIS-PARISOT L., GRINFELD S., FOULQUIER F., DUPRAT A.M., HOUILLON C., AIMAR C., DOURNON C., BAUTZ A., 1994 - Fécondation et embryogenèse réalisées chez le triton in vivo dans l'espace (Projet FERTILE). "Sciences Physiques et Sciences de la Vie : quatre années de recherche scientifique dans l'espace, 1990-1994", CNES, 483-486.
- 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.

- GUALANDRIS-PARISOT L., HUSSON D., BAUTZ A., DURAND D., KAN P., AIMAR C., MEMBRE H., DUPRAT A-M., DOURNON C., 2002 - Effects of space environment on embryonic growth up to hatching of salamander eggs and developed during orbital flights. *Biol. Sci. Space*, 2002, **16**, 3-11.
- HUSSON D., CHAPUT D., BAUTZ A., DAVET J., DURAND D., DOURNON C., DUPRAT A.-M., GUALANDRIS-PARISOT L., 2001 - Design of specific hardware to obtain embryos and maintain adults urodele amphibians aboard a space station. *Adv. Space Res.*, 27, 433-445.
- 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. Space*, **11**, 153-167.
- MOGAMI Y., IMAMIZO M., YAMASHITA M., IZUMI-KUROTANI A., WIEDERHOLD M.L., KOIKE H., ASASHIMA M., 1996 - Astronewt : early development of newt in space. *Adv. Space Res.*, **17**, 257-263.
- PASTEELS J., 1938 - Recherches sur les facteurs initiaux de la morphogenèse chez les Amphibiens Anoures. I. Résultats de l'expérience de Schultze et leur interprétation. *Arch. Biol.*, **49**, 629-667.
- PASTEELS J., 1940a - Recherches sur les facteurs initiaux de la morphogenèse chez les Amphibiens Anoures. III. Effets de la rotation de 135° sur l'œuf insegmenté, muni de son croissant gris. *Arch. Biol.*, **51**, 103-149.
- PASTEELS J., 1940b - Recherches sur les facteurs initiaux de la morphogenèse chez les Amphibiens Anoures. IV. Centrifugation axiale de l'œuf fécondé et insegmenté. *Arch. Biol.*, **51**, 335-386.
- PASTEELS J., 1941 - Recherches sur les facteurs initiaux de la morphogenèse chez les Amphibiens Anoures. V. Les effets de la pesanteur sur l'œuf de *Rana fusca* maintenu en position anormale avant la formation du croissant gris. *Arch. Biol.*, **52**, 321-339.
- RAHMANN H., SLENZKA K., 1994 - Influence of gravity on early development of lower aquatic Vertebrates. *Proceedings 5<sup>th</sup> Eur. Symp. on "Life Sciences Research in Space"*, ESA **SP-366**, 147-152.
- SCHULTZE O., 1894 - Die künstliche Erzeugung von Doppelbildungen bei Froschlarven mit Hilfe abnormer Gravitation. *Roux Arch. Entw.*, **1**, 269-305.
- SOUZA K.A., BLACK S.D., WASSERSUG R.J., 1995 - Amphibian development in the virtual absence of gravity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 1975-1978.
- UBBELS G.A., 1977. Symmetrization of the fertilized egg of *Xenopus laevis* (studied by cytological, cytochemical and ultrastructural methods). *Mém. Soc. Zool. Fr.*, **41**, 103-115.
- UBBELS G.A., 1988. Une première...des œufs de Vertébrés fécondés dans l'espace. *Les échos de la microgravité, ESA*, **1**, 19-23.

- UBBELS G.A., 1991. The role of the gravity in the establishment of the dorso-ventral axis in the amphibian embryo. *Microgravity News from ESA*, **4**, 16-17.
- UBBELS G.A., BERENDSEN W., NARRAWAY J., 1989 - Fertilization of frog eggs on a sounding rocket in space. *Adv. Space Res.*, **9**, 187-197.
- UBBELS G.A., REIJINEN M., NARRAWAY J., 1994 - *Xenopus laevis* embryos can establish their spatial bilateral symmetrical body pattern without gravity. *Adv. Space Res.*, **14**, 257-269.
- YAMASHITA M., IZUMI-KUROTANI A., IMAMIZO M., KOIKE H., OKUNO M., PFEIFFER C.J., KOMAZAKI S., SASAKI F., OHIRA Y., KASHIMA I., KIKUYAMA S., OHNISHI T., MOGAMI Y., ASASHIMA M., 2001 – Japanese red-bellied newts in space. astronewt experiment on space shuttle IML-2 and space flyer unit. *Biol. Sci. Space*, **15**, 96-103.