

## ACTION DES $\gamma$ - ET $\delta$ -HEXACHLOROCYCLOHEXANES SUR L'OEUF D'OURSIN AVANT ET APRÈS FÉCONDATION\*

par

PAULETTE CHAIX ET LUCIE LACROIX

*Laboratoire de Chimie biologique, Institut de Chimie de l'Université, Lyon (France)*

L'action du  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane ou gammexane sur des organismes d'animaux monocellulaires, a déjà fait l'objet de quelques travaux. D'après LLOYD<sup>1</sup>, le gammexane à des concentrations de  $1 \cdot 10^{-5}$  à  $1 \cdot 10^{-6}$ , inhibe la division nucléaire de *Paramecium caudatum* qui présente alors des formes géantes; à ces concentrations, le gammexane est toxique pour les protozoaires en question, qui en sa présence, finissent par mourir. A des concentrations plus faibles, de l'ordre de  $1 \cdot 10^{-6}$  à  $5 \cdot 10^{-7}$ , le gammexane provoque l'apparition de formes anormales bourgeonnantes ou ramifiées, sans causer la mort des organismes. D'autre part, étudiant l'action des différents isomères de l'hexachlorocyclohexane vis-à-vis de *Glaucoma piriformis*, nous avons constaté<sup>2</sup> que sont immédiatement mortels à des concentrations voisines de  $2 \cdot 10^{-5}$  l'isomère  $\delta$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  l'isomère  $\gamma$  et  $2 \cdot 10^{-4}$  l'isomère  $\alpha$ , alors que l'isomère  $\beta$  n'exerce guère d'action toxique.

Ces premières observations nous ont incitées à poursuivre l'étude du rôle de la configuration stéréochimique dans la toxicité manifestée par les différents hexachlorocyclohexanes en recherchant, entre autres choses, s'il s'agit ici vraiment d'une action spécifique sur la multiplication cellulaire. Les investigations que nous avons poursuivies dans ce sens, ont porté sur les oeufs de deux espèces d'oursins, *Psammechinus microtuberculatus* et *Sphoerechinus granularis*, sur lesquels nous avons fait agir avant la fécondation, et à différentes phases du développement de l'oeuf après fécondation, les isomères  $\gamma$ - et  $\delta$ - de l'hexachlorocyclohexane.

### Résultats

Les détails expérimentaux et les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux I et II, en ce qui concerne les oeufs de *Psammechinus microtuberculatus*, et dans le tableau III, en ce qui concerne les oeufs de *Sphoerechinus granularis*. Dans ces tableaux, des essais témoins recevant uniquement de l'alcool éthylique à 95°, introduit à la concentration de 2 ou de 3 %, dans chacune des conditions indiquées ci-après, montrent qu'à ces concentrations, l'alcool ne détermine aucune lésion apparente, mais provoque seulement une légère accélération de la division cellulaire.

Les observations consignées dans les tableaux I et II permettent les conclusions suivantes: L'isomère  $\gamma$  à la concentration de 0.02 %, n'a pour effet que de retarder légèrement le processus de division cellulaire. L'isomère  $\delta$  présente à cette même concentration une forte toxicité se manifestant essentiellement, dans les essais NF et F<sub>1</sub>, par

\* Ce travail a été exécuté à la Station Zoologique de Naples. Nous sommes heureuses de remercier ici Mr. DOHRN de l'accueil si aimable que nous avons trouvé à la Station.

l'absence de soulèvement de la membrane et, dans tous les cas d'oeufs fécondés, par le blocage de la division avec lyse cellulaire.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### Techniques

Les isomères de l'hexachlorocyclohexane sont utilisés en solutions alcooliques (éthanol à 95°)<sup>2</sup>.

Les oeufs d'oursins, récoltés suivant la technique habituelle, sont mis en suspension dans de l'eau de mer.

Les expériences sont réalisées de la façon suivante: A 1 ml de suspension d'oeufs d'oursins non fécondés (N) ou fécondés (F) placés dans un godet de verre, sont ajoutés, à un temps donné, 0.02 ml ou 0.03 ml d'une solution alcoolique de concentration déterminée de l'un des hexachlorocyclohexanes. Après agitation de la préparation, l'état morphologique des oeufs est examiné au microscope sur des prises d'essai placées dans des lames creuses.

En vue de rechercher si la sensibilité de l'oeuf d'oursin vis-à-vis des isomères  $\gamma$  et  $\delta$  varie suivant

TABLEAU I

ACTION DES  $\gamma$ - ET  $\delta$ -HEXACHLOROCYCLOHEXANES SUR L'OEUF DE *Psammechinus microtuberculatus* AVANT OU APRÈS FÉCONDATION

Concentration de l'alcool (95°) dans la suspension = 2 %

Concentration de l'isomère  $\gamma$  ou de l'isomère  $\delta$  dans la suspension = 0.02 %

T = temps de contact, en minutes, des oeufs d'oursins avec les différentes substances étudiées

M = soulèvement normal de la membrane. M<sub>0</sub> = absence de soulèvement

D<sub>0</sub> = pas de division cellulaire

D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>4</sub> = stades de division

Les indications ci-dessous correspondent à l'aspect morphologique des oeufs.

Condi- tions expéri- mentales	T	Oeufs té- moins	Substances ajoutées		
			Alcool	$\gamma$ -hcch	$\delta$ -hcch
N	50		Normaux	Normaux	Légère altération
NF	8	M	M	M <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
NF	50	M	Normaux	Sensiblement normaux	Cellules un peu attaquées
NF	90	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub>	D <sub>0</sub> ; quelques cellules lysées	D <sub>2</sub> ; cellules lysées
F <sub>1</sub>	8	M	M	M <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
F <sub>1</sub>	50	D <sub>0</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>0</sub> ; fuseaux en voie de division	D <sub>0</sub> ; altérations nettes
F <sub>1</sub>	90	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub> rares	D <sub>0</sub> ; lyses
F <sub>2</sub>	20	M	M	M; spermasters évolutifs	M rares, pas d'évolution du spermaster; quelques cellules lysées
F <sub>2</sub>	60	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub> anormales	D <sub>0</sub> , agglutination; nombreuses lyses
F <sub>2</sub>	90	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>0</sub> , lyse partielle
F <sub>3</sub>	30	M	M	M	M
F <sub>3</sub>	80	D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub>	D <sub>0</sub> ; pas d'altération; division bloquée
F <sub>4</sub>	40	D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub> ; nombreuses cellules lysées

TABLEAU II

ACTION DU  $\delta$ -HEXACHLOROCYCLOHEXANE, A DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS, SUR LE DÉVELOPPEMENT DE L'OEUF DE *Ssammechinus microtuberculatus*

Concentration de l'alcool (95°) dans la suspension = 2%

Nomenclature comme dans le tableau I.

Condi- tions expéri- mentales	T	Oeufs té- moins	Concentration en % du $\delta$ -hcch dans les suspensions		
			0.02	0.004	0.002
N	75		Cellules normales	Cellules normales	Cellules normales
NF	20	M	M <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
NF	80	D <sub>2</sub>	M rares; D <sub>0</sub>	D <sub>2</sub> anormales; quelques D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub> ; anomalies de division
NF	160	D <sub>4</sub>	D <sub>0</sub> ; rares cellules lysées	D <sub>4</sub> ; nombreuses anomalies de division	D <sub>4</sub> ; anomalies de division
F <sub>2</sub>	12	M	M; pas de formation du spermaster	M; formation de quelques spermasters	M
F <sub>2</sub>	70	D <sub>2</sub>	D <sub>0</sub> ; ébauche de division anormale	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>
F <sub>2</sub>	160	D <sub>4</sub>	Rares ébauches de divisions anormales	D <sub>4</sub> ; quelques anomalies	D <sub>4</sub> ; rares anomalies
F <sub>3</sub>	45	D <sub>2</sub>	idem (divisions bloquées à l'intérieur de M)	D <sub>2</sub> ; blocage partiel des divisions	D <sub>2</sub>
F <sub>3</sub>	160	D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub> monstrueuses	D <sub>4</sub> irrégulières	D <sub>4</sub>

TABLEAU III

ACTION DES  $\gamma$ - ET  $\delta$ -HEXACHLOROCYCLOHEXANES SUR LE DÉVELOPPEMENT DE L'OEUF DE *Sphoerechinus granularis*

Concentration de l'alcool (95°) dans la suspension = 3%

Concentration de l'isomère  $\gamma$  ou de l'isomère  $\delta$  dans la suspension = 0.03 %

Nomenclature comme dans le tableau I

Condi- tions expéri- mentales	T	Oeufs té- moins	Substances ajoutées		
			Alcool	$\gamma$ -hcch	$\delta$ -hcch
F <sub>1</sub>	29	M	M	M	M
F <sub>1</sub>	110	début • D <sub>2</sub>	début D <sub>2</sub>	D <sub>0</sub>	D <sub>0</sub>
F <sub>1</sub>	129	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	quelques D <sub>2</sub>	D <sub>0</sub>
F <sub>1</sub>	195	D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub> ; quelques D <sub>4</sub>	D <sub>0</sub> ; lyse
F <sub>2</sub>	35	M	M	M	M
F <sub>2</sub>	120	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>0</sub> ; altérations	D <sub>0</sub> ; grosses altérations
F <sub>2</sub>	200	D <sub>4</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub> rares; quelques lyses	D <sub>0</sub> ; lyse
F <sub>3</sub>	95	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>0</sub>	D <sub>0</sub>
F <sub>3</sub>	190	D <sub>4</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>0</sub> ; nombreuses lyses à l'intérieur de M
F <sub>4</sub>	90	D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>0</sub>	D <sub>0</sub>
F <sub>4</sub>	180	D <sub>4</sub> , D <sub>8</sub>	D <sub>4</sub>	ébauches D <sub>2</sub> , D <sub>4</sub>	D <sub>0</sub> ; lyses

Bibliographie p. 90.

la phase du développement, nous avons introduit les solutions alcooliques de ces isomères dans six conditions différentes correspondant à divers états de la couche corticale de l'oeuf<sup>3, 4, 5</sup>, utilisant :

1. des suspensions d'oeufs non fécondés auxquels on ne fera subir aucune fécondation: essais N.
2. des suspensions non fécondées initialement, mais fécondées après introduction des isomères: essais NF.
3. des suspensions fécondées depuis moins de deux minutes: essais F<sub>1</sub> (oeufs dont la membrane de fécondation n'est pas soulevée).
4. des suspensions fécondées depuis cinq minutes: essais F<sub>2</sub> (oeufs dont la membrane de fécondation est déjà soulevée).
5. des suspensions fécondées depuis vingt à trente minutes: essais F<sub>3</sub>.
6. des suspensions fécondées depuis cinquante minutes: essais F<sub>4</sub> (correspondant à l'anaphase et à la télophase précédant le premier clivage de l'oeuf).

Dans les essais F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> et F<sub>4</sub> (hexachlorocyclohexane introduit après le soulèvement de la membrane de fécondation), il est remarquable de noter que cette lyse a lieu à l'intérieur de cette membrane, qui demeure apparemment intacte: la membrane de fécondation est donc perméable au  $\delta$ -hexachlorocyclohexane. Pour une concentration en isomère  $\delta$  de 0.004 %, la division de l'oeuf n'est plus bloquée; elle est seulement retardée. On observe alors toute une série de figures de division aberrantes. Pour la concentration de 0.002 %, les mêmes phénomènes se retrouvent, mais uniquement dans les essais NF et F<sub>2</sub>, et d'une façon plus atténuée.

Des observations analogues, consignées dans le tableau III, ont été faites sur les oeufs de *Sphoerechinus granularis* dont le développement est presque deux fois plus lent que celui des oeufs de *Psammechinus microtuberculatus*. Une concentration de 0.03 % en isomère  $\gamma$  ou en isomère  $\delta$ , provoque sur l'oeuf de *Sp. granularis*, les mêmes effets qu'une concentration de 0.02 % sur *Ps. microtuberculatus*.

D'autre part, nous avons cherché, en opérant avec les oeufs de *Ps. microtuberculatus*, à mettre en évidence une action protectrice éventuelle du mésoinositol vis-à-vis du gammexane. Pour ce faire, nous avons introduit dans le milieu une quantité de mésoinositol telle que sa concentration finale fût de 0.02 %, cette introduction étant faite soit avant, soit en même temps que celle du gammexane dont la concentration finale était également de 0.02 %. Nous n'avons observé dans aucun cas la suppression évidente de l'action toxique du gammexane par le mésoinositol.

### Conclusions

Comme d'autres cellules vivantes, l'oeuf d'oursin est sensible à l'action toxique des  $\gamma$ - et  $\delta$ -hexachlorocyclohexanes. Comme nous l'avons déjà constaté dans le cas du cilié *Glaucoma piriiformis*, l'isomère  $\delta$  présente ici une action toxique plus forte que l'isomère  $\gamma$ .

La sensibilité de l'oeuf d'oursin aux isomères en question est maximum dans les dix premières minutes qui suivent la fécondation. Ce fait dépend probablement des variations de la constitution et de la perméabilité de la membrane, au cours du développement de l'oeuf.

La membrane de fécondation est remarquablement perméable aux hexachlorocyclohexanes, et échappe au processus de lyse provoquée par l'isomère  $\delta$  sur le reste de la cellule.

Enfin, de même que dans le cas de *Glaucoma piriiformis*<sup>2</sup>, le mésoinositol n'exerce aucun effet protecteur net vis-à-vis du gammexane. Il ne semble donc pas que la toxicité de ce dernier puisse s'expliquer par un antagonisme vis-à-vis du mésoinositol.

## RÉSUMÉ

Les isomères  $\gamma$  et  $\delta$  de l'hexachlorocyclohexane, à la concentration de  $2 \cdot 10^{-4}$ , exercent une action toxique vis-à-vis des oeufs de *Psammecinus microtuberculatus* et de *Sphoerichinus granularis*, avant et après fécondation. Cette toxicité est surtout marquée dans le cas de l'isomère  $\delta$  qui provoque l'arrêt de toute division cellulaire de l'oeuf fécondé; cet arrêt est suivi d'une lyse se faisant à l'intérieur de la membrane de fécondation, qui reste apparemment intacte, ce qui montre la perméabilité de cette membrane à l'isomère  $\delta$ . A des concentrations de  $4 \cdot 10^{-5}$  à  $2 \cdot 10^{-5}$ , l'isomère  $\delta$  ne provoque plus l'arrêt de la division cellulaire, mais l'apparition de toute une série de figures aberrantes de division.

Le mésoinositol n'exerce aucun effet protecteur de l'oeuf fécondé ou non, contre l'action du gammexane.

## SUMMARY

The  $\gamma$  and  $\delta$  isomers of hexachlorocyclohexane, at a concentration of  $2 \cdot 10^{-4}$ , exercise a toxic action on the eggs of *Psammecinus microtuberculatus* and *Sphoerichinus granularis* both before and after fertilisation. This toxicity is especially marked with the  $\delta$  isomer, which arrests all cell division of the fertilised egg, and afterwards there takes place a lysis within the fertilisation membrane (which apparently remains intact) which shows that this membrane is permeable to the  $\delta$  isomer. At concentrations of  $4 \cdot 10^{-5}$  to  $2 \cdot 10^{-5}$  the  $\delta$  isomer does not prevent cell division but brings about a whole series of aberrations.

Meso-inositol exerts no protective effect at all on the egg, fertilised or not, against the action of gammexane.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die  $\gamma$  und  $\delta$ -Isomere des Hexachlorcyclohexans üben in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-4}$  eine toxische Wirkung auf Eier von *Psammecinus microtuberculatus* und *Sphoerichinus granularis*, und zwar vor und nach der Befruchtung, aus. Diese Toxizität ist vor allem bei dem  $\delta$ -Isomer stark ausgeprägt, das alle Zellteilungen des befruchteten Eies zum Stillstand bringt; diesem Stillstand folgt eine Lyse, die sich im Inneren der Befruchtungsmembran abspielt, welche anscheinend intakt bleibt, was die Permeabilität dieser Membran für das  $\delta$ -Isomer zeigt. Bei Konzentrationen von  $4 \cdot 10^{-5}$  bis  $2 \cdot 10^{-5}$  verursacht das  $\delta$ -Isomer nicht mehr den Stillstand der Zellteilung, sondern das Auftreten einer ganzen Reihe von abweichenden Teilungsfiguren.

Das Mesoinositol hat keinerlei Schutzwirkung auf das befruchtete oder unbefruchtete Ei gegen die Wirkung von Gammexan.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> L. LLOYD, *Nature*, 159 (1947) 135.
- <sup>2</sup> P. CHAIX, L. LACROIX ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 57.
- <sup>3</sup> E. V. COWDRY, *General Cytology*, The University of Chicago Press (1925).
- <sup>4</sup> D. HOBSON, *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, 47 (1927) 94.
- <sup>5</sup> A. MONROY ET G. MONTALENTI, *Nature*, 158 (1946) 239.
- <sup>6</sup> S. KIRKWOOD ET P. H. PHILLIPS, *J. biol. Chem.*, 163 (1946) 251.

Reçu le 3 Octobre 1947