

L'ORGANISATION DU VITELLUS DANS LES ŒUFS D'AMPHIBIENS

par

JACQUES PANIJEL*

*Laboratoire de Morphologie Animale et de Physiologie cellulaire, Faculté des Sciences,
Université de Bruxelles (Belgique)*

I. INTRODUCTION

L'œuf d'Amphibien, classé par les systématiciens parmi les œufs "mésolécithiques", contient un vitellus abondant distribué asymétriquement entre le pôle animal et le pôle végétatif et déterminant ainsi, au moins en partie, la polarité. L'ovogénèse est essentiellement caractérisée par cette accumulation de vitellus (grand accroissement) tandis que sa consommation va de pair avec l'embryogénèse. L'importance fonctionnelle du vitellus n'est donc pas douteuse: pourtant, si de nombreux travaux ont été consacrés soit à la description histologique des procès de vitellogénèse et de vitellolyse, soit à des études chimiques sur vitellus isolé, ou sur certains de ses produits d'extraction, il en est peu qui se soient appliqués à cette étude sur le plan de la physiologie cellulaire, en faisant appel aux méthodes biochimiques dont l'emploi s'est avéré si fécond dans l'analyse des constituants cellulaires. Le présent travail constitue un essai d'approche effectué en ce sens.

II. OBSERVATIONS PRÉLIMINAIRES

1. *Données cytologiques*: les phénomènes sont très comparables chez la plupart des Amphibiens; la vitellogénèse débute, en effet, dans la région corticale où les premières granulations vitellines apparaissent après désagrégation du "noyau vitellin". L'oocyte mesure alors de 350 à 400 μ et le vitellus se présente sous forme de petites granulations sphériques de 1 à 2 μ de diamètre; le cytoplasme, très basophile, est déjà bourré d'inclusions graisseuses, tandis que simultanément, apparaissent les inclusions glycogéniques. Inclusions vitellines et glycogéniques viennent au contact du noyau et finissent par l'entourer complètement; mais, tandis que la production de glycogène reste sensiblement limitée, la synthèse de vitellus augmente continûment; aux petites granulations initiales font suite des inclusions ovoïdes de plus en plus grandes et enfin des formations parallélipipédiques à coins arrondis dont les plus grandes ne mesurent pas moins de 15 μ sur leur plus grand axe. Cette période de grand accroissement qui comporte tout à la fois production massive de vitellus et diminution progressive de la basophilie cytoplasmique va aboutir à un remaniement structural sur lequel PASTEELS²² a attiré

* Adresse actuelle: Service de Biochimie — Institut du Cancer — Villejuif, Paris (France).

l'attention et dont résultera l'organisation topographique du vitellus en trois zones distinctes que l'on retrouve chez l'œuf mûr :

a. une zone marginale pigmentée, riche en graisses et en glycogène, correspondant à la partie animale de l'œuf: le matériel vitellin, qui dérive directement de la première zone sous-corticale de vitellogénèse, s'y présente essentiellement sous forme de petites granulations sphériques et ovoïdes plus ou moins dispersées; c'est ce matériel qui constitue la très grande majorité des formations que nous désignerons ici comme "petites plaquettes".

b. une zone intermédiaire dérivant d'une région basophile sous-nucléaire—laquelle se comporte comme une zone de vitellogénèse secondaire—et qui comprend un mélange de formations vitellines de tailles diverses: il semble qu'il s'agisse là, en quelque sorte, d'éléments de transition entre les petites plaquettes de la zone 1 et les grandes plaquettes de la zone 3.

c. une zone pratiquement dépourvue de pigment, bourrée de grandes formations vitellines ovoïdes ou parallélipédiques que nous désignerons ici comme "grandes plaquettes".

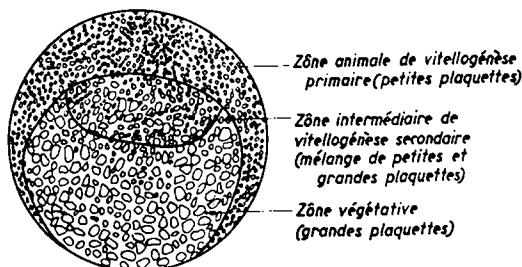


Fig. 1

Le schéma ci-contre (Fig. 1) montre clairement les dispositions relatives des trois zones.

Durant l'embryogénèse, les premiers clivages s'effectueront selon une telle distribution différentielle du matériel vitellin: les micromères contiendront les petites plaquettes, les macro-

mères les grosses et les cellules de la zone intermédiaire un mélange des deux. On voit donc que les résultats de l'étude histologique, si limités soient-ils, ne laissent pas de doute sur ce fait important que le vitellus est un matériel "organisé", c'est-à-dire que, dans la mesure même où l'on voudrait le considérer comme un matériel de réserve biologiquement "inerte", — nous reviendrons ci-dessous sur ce point —, on devrait cependant convenir qu'il reste très différent à cet égard des autres inclusions deutoplasmiques, — granules lipidiques ou glycogéniques, — qui, elles, ne présentent nullement l'apparence de telles zones morphologiquement organisées.

2. *Données cytochimiques.* Celles-ci sont peu nombreuses et de valeur très discutable. Il est difficile d'attribuer une signification chimique aux observations de H. HIBBARD¹³ ou de KONOPACKI¹⁷ qui signalent certaines variations d'affinité des plaquettes pour divers colorants histologiques. Les seuls résultats sérieux concernent la basophilie et la détection de certains acides aminés (BRACHET^{2, 3}). La basophilie est très faible. La réaction de la tyrosine pratiquée selon THOMAS²⁶ ou SERRA²⁵ est positive, ainsi que la réaction de l'arginine pratiquée selon SERRA²⁵: BRACHET signale d'ailleurs que ces deux réactions sont plus intenses dans les grosses plaquettes que dans les petites. On observe donc ainsi un gradient opposé à celui de l'acide ribonucléique cytoplasmique et, comme nous le verrons ci-dessous, à celui de l'acide ribonucléique du vitellus même. Enfin, pour ce qui concerne les groupes SH, la réaction au nitroprussiate est négative, lorsque la méthode est appliquée avec les soins nécessaires en cytologie, qu'on ait ou non effectué auparavant la dénaturation par l'acide trichloracétique. BRACHET² signale cependant une exception, chez l'*Axolotl*, où la réaction est fortement positive après dénaturation brutale.

Ainsi, le résultat le plus clair de l'étude microscopique est-il, d'une part, de lier la vitellogénèse comme la vitellolyse au métabolisme des nucléoprotéines et par suite, plus généralement, à celui des composés phosphorés, d'autre part, de faire apparaître le matériel vitellin comme un matériel structuré où la distinction entre grandes et petites plaquettes notamment semble bien correspondre à une différenciation morphologique importante. La question se pose alors de savoir si cette différenciation a une valeur biochimique réelle et, notamment, si la production des plaquettes vitellines (et ultérieurement leur métabolisation) est liée au fonctionnement des granules cytoplasmiques étudiés par CLAUDE⁸, BRACHET⁴⁻⁶, JEENER⁸⁻¹⁵ etc., et dont BRACHET⁵ a montré le rôle de premier plan qu'ils jouent dans l'ovogénèse comme dans l'embryogénèse: il s'agit en somme de savoir si cette organisation morphologique du vitellus s'accompagne d'une certaine organisation biochimique susceptible d'être liée à l'existence et au fonctionnement de ces granules cytoplasmiques. C'est pourquoi nous avons cherché à fractionner le vitellus selon cette distinction entre "grandes" et "petites plaquettes", qui, au moins en première approximation, semble bien correspondre à une certaine hétérogénéité morphologique et physiologique.

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *Opérations de fractionnement*: après différents essais d'orientation sur œufs de *Rana fusca* et d'*Axolotl*, dont nous rapporterons plus loin les résultats, nous nous sommes arrêtés, pour le travail détaillé, aux œufs de *Rana esculenta*, dont la faible surcharge pigmentaire simplifie considérablement les opérations. Les expériences sont effectuées de janvier à mars. Toutes les opérations sont faites en chambre froide. Les animaux sacrifiés sont rapidement ouverts, les ovaires, riches en gros oocytes, sont lavés dans NaCl isotonique froid puis mis en suspension dans une certaine quantité de cette solution (environ 5 ml par ovaire). On broie alors de façon grossière au broyeur de POTTER; il n'y a pas d'intérêt à effectuer un broyage très soigné, l'obtention d'un homogénéisat trop fin compliquant la séparation ultérieure du pigment. Le broyat est centrifugé en tubes coniques, soit pendant 3' en portant progressivement jusqu'à 3 500 t/m puis en ralentissant aussitôt pour revenir progressivement à l'arrêt, soit en centrifugeant 7' à 2 700 t/m. La stratification obtenue est ainsi fort nette (Fig. 2): on observe les trois couches superposées déjà maintes fois décrites: débris cellulaires, vitellus blanc, couche vivement pigmentée, avec un surnageant opalescent à la surface duquel flotte un important gâteau lipidique jaunâtre. On élimine le surnageant et le gâteau lipidique. Lorsque la stratification n'est pas nette, — et notamment, lorsque le vitellus présente une couleur plus ou moins marron due à une certaine contamination par le pigment, — il est indispensable de remettre en suspension dans un plus grand volume de NaCl isotonique (par exemple 100 ml si l'on avait précédemment employé un total de 15 ml) et de reprendre la centrifugation comme ci-dessus.

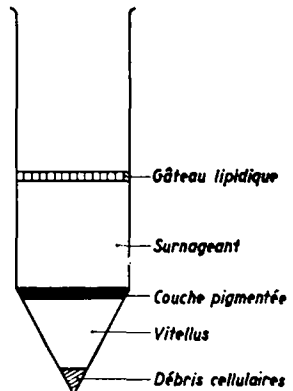


Fig. 2

Après élimination du surnageant et du gâteau lipidique, on procède à l'aide d'une fine tige de verre au grattage soigneux de la couche pigmentée qu'on élimine ainsi

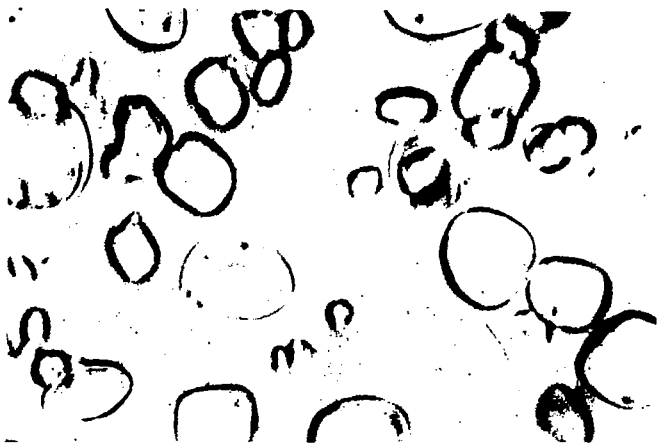


Fig. 3A (voir p. 347)

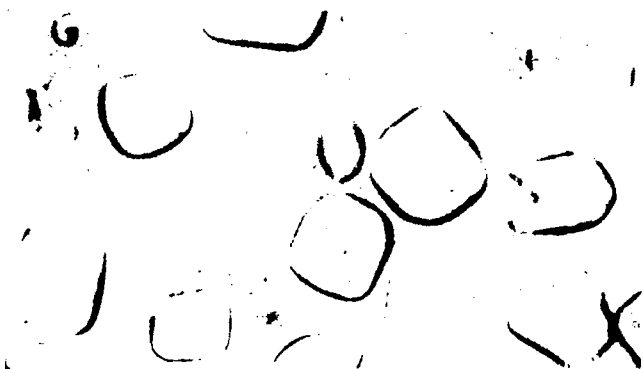


Fig. 3B (voir p. 348)

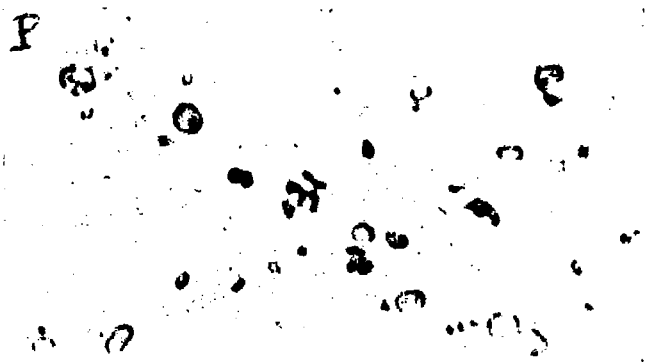


Fig. 3C (voir p. 348)

jusqu'à apparition à la surface de la couche vitelline. On remet en suspension dans deux à trois fois le volume précédent (c'est-à-dire de 30 à 50 ml) de NaCl isotonique. On élimine les débris cellulaires, soit par décantation, soit par très courte centrifugation de 30'' à 1 500 t/m. Puis, par quatre à cinq remises en suspension dans ce même volume, suivies de centrifugations de 3' à 1 500 t/m on débarrasse le vitellus de toute trace de pigment.

On se trouve alors en présence de la fraction "Vitellus total" que l'on remet en suspension dans NaCl isotonique froid (par exemple 200 ml si l'on est parti de trois ovaires).

Pour vérification, on effectue un frottis de cette solution. On observe (Fig. 3A) un mélange de "grandes" et de "petites plaquettes" avec, bien entendu, entre les deux, des particules de taille intermédiaire, comme sur le vivant; mais, comme sur le vivant encore, il est possible sans difficulté d'apercevoir qu'une répartition globale des plaquettes s'effectue entre deux maxima de fréquence seulement, qui, chacun, définissent une catégorie de plaquettes; on est donc bien fondé, semble-t-il, à tenter un tel fractionne-

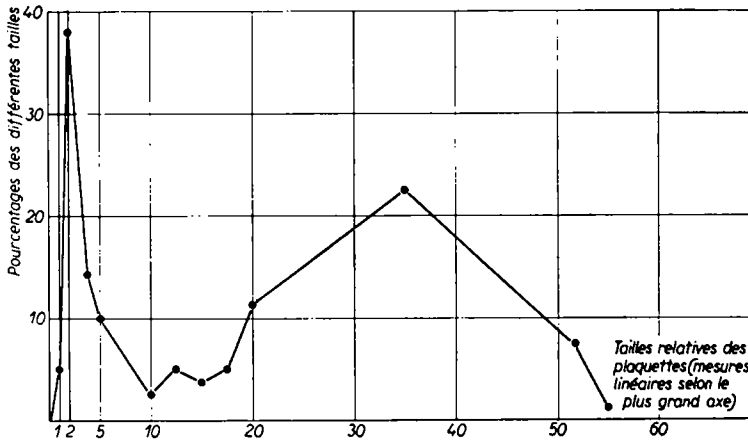


Fig. 4

ment entre ces deux catégories, puisqu'une éventuelle catégorie de plaquettes "intermédiaires" devrait dans ces conditions être également définie par un maximum de fréquence (Fig. 4).

Sur les 200 ml de la suspension "vitellus total" (solution V), 50 ml sont conservés comme solution témoin. Au début de nos expériences, nous nous contentions de conserver cette suspension témoin dans NaCl isotonique froid pendant la durée du fractionnement. Mais, ultérieurement, il est apparu que, pour des raisons sur lesquelles nous reviendrons, il est indispensable pour avoir un témoin satisfaisant, de mettre alternativement celui-ci en suspension dans NaCl isotonique et dans le sucrose 15%, à chaque fois que de telles opérations sont pratiquées pour le fractionnement.

Sur les 150 ml de solution V restante, on procède au fractionnement en vérifiant à chaque étape les progrès de l'opération par examen microscopique de frottis. La technique à laquelle nous nous sommes arrêté a été la suivante:

On centrifuge la solution V 3' à 4 000 t/m de façon à faire tomber le vitellus sans que le culot soit cependant trop compact. On vérifie que le surnageant ne contient plus de plaquettes en suspension; dans le cas contraire on centrifuge jusqu'à ce qu'il en soit

ainsi. On réunit les culots V_1 qu'on remet en suspension dans 200 ml de sucrose à 33% tamponné à p_H 7 par tampon carbonate 0.1 M . Il est nécessaire d'avoir une suspension très homogène et, le cas échéant, il peut être utile, si la remise en suspension est difficile, de repasser à nouveau par l'homogénéiseur.

La solution de sucrose V_2 ainsi obtenue est répartie dans une ou plusieurs éprouvettes, les plus longues et les plus étroites possible. On laisse décanter en chambre froide pendant deux heures et l'on recueille séparément le surnageant S_2 et le culot G_2 . S_2 est centrifugé 1'30" à 2 800 t/m, le culot éliminé: on a S_3 . On ajoute à S_3 un volume égal de tampon de façon à réduire la concentration en sucrose de moitié; on transvase en tubes à centrifuger coniques et l'on centrifuge 30" à 2 800 t/m. On rejette le surnageant et l'on a P_1 constitué par une très grande majorité de petites plaquettes.

G_1 est lui-même constitué par une très grande majorité de grandes plaquettes.

On se trouve donc en présence de deux fractions P_1 et G_1 qui sont l'une et l'autre encore des mélanges des plaquettes des deux catégories avec, cependant, en chaque cas nette prédominance de l'une d'elles. Du fait même de la taille et de la densité des divers éléments que l'on cherche à séparer, les techniques usuelles de centrifugation sont, comme on l'a vu, impraticables, et l'on est contraint de faire alterner décantations et brèves centrifugations à petite vitesse. Par ailleurs, il n'est pas possible sans inconvénient d'augmenter au delà de 33% la concentration en sucrose. Nous avons donc dû, sur les fractions de départ P_1 et G_1 , opérer de la façon suivante:

a. *Fraction P_1* : l'on remet en suspension en solution NaCl isotonique suivie de décantation, en éliminant à chaque fois le culot. On répète cette opération autant de fois qu'il est nécessaire (de trois à dix fois selon les cas) pour obtenir une préparation de petites plaquettes dépourvues de grandes. On a alors P qu'on remet en suspension dans un volume connu de NaCl isotonique (50 ml).

b. *Fraction G_1* : l'on remet en suspension dans une solution à volume égal sucrose 33%-NaCl isotonique. On laisse décanter et l'on élimine le surnageant. On répète cette opération autant de fois qu'il est nécessaire (de cinq à quinze fois) pour obtenir une préparation de grandes plaquettes dépourvues de petites. Le culot est alors lavé à plusieurs reprises dans NaCl isotonique et finalement remis en suspension dans un volume connu (100 ml). On a ainsi la suspension de grandes plaquettes G .

On dispose donc désormais de P , suspension de "petites plaquettes" et G , suspension de "grandes plaquettes"; les clichés reproduits dans les Fig. 3B et 3C montrent bien que cela ne signifie pourtant pas que chacune des préparations soit entièrement dépourvue de ces plaquettes de taille intermédiaire dont il a été ci-dessus question. C'est ainsi qu'on trouve encore en G quelques unes des plus grandes des petites plaquettes et en P quelques unes des plus petites des grandes; mais les unes et les autres sont, en chaque cas, en petit nombre et l'on peut considérer que le fractionnement est assez satisfaisant pour permettre une comparaison valable entre les constitutions des deux types de plaquettes.

La méthode de séparation qui vient d'être exposée n'est à vrai dire ni commode, ni élégante: elle est cependant la seule possible. L'inconvénient majeur réside dans le nombre des décantations et remises en suspensions nécessaires: par ailleurs cependant, — pour des raisons sur lesquelles nous reviendrons, — il est indispensable que le fractionnement soit terminé le plus rapidement possible; ceci exige donc de proscrire les décantations "de nuit" et il peut être nécessaire dans certains cas de poursuivre les opérations durant 18 heures d'affilée. De plus, rappelons que chaque étape est contrôlée par examen microscopique: de ce fait, il est certain que l'on est porté à une extrême exigence sur

l'aspect des préparations et que ceci amène à multiplier les opérations; lorsqu'au contraire on pratique des centrifugations différentielles sur éléments submicroscopiques, l'exigence visuelle ne joue plus et la définition physique des fractions, — à savoir leur vitesse de sédimentation, — constitue le critère essentiel, sans que toutes sortes d'accidents possibles (agglomérations, contaminations, destructions de granules etc.) alertent le manipulateur. Ici, au contraire, la définition physique fait défaut et la détermination visuelle des fractions est le seul critère possible.

2. *Méthodes analytiques.* Chacune des fractions a été dosée pour l'ensemble de ses composés phosphorés.

A. *Méthodes de dosage:* Tous les dosages sont effectués en triple.

L'azote est dosé par micro-KJELDAHL. Appareil de MARKHAM⁴⁰. Titration à l'aide d'une micro-burette de LINDERSTRØM-LANG. Quantité de N par prise: 10 à 50 γ /ml. Minéralisation par SO_4H_2 . Catalyseur au palladium.

Le Phosphore est dosé par la méthode de BERENBLUM ET CHAIN¹. Minéralisation: acide perchlorique et perhydrol; dans le cas d'utilisation des solvants lipidiques, évaporation préalable. Quantité de P par prise: de $\frac{1}{2}$ à 6 γ /ml.

Le ribose est dosé par la méthode à l'orcine selon DAVIDSON ET WAYMOUTH⁸. La lecture est effectuée au BECKMANN en prenant soin de prendre toujours la courbe caractéristique entre 4000 et 7000 Å de façon à éliminer toute erreur due aux surcharges en hexose.

L'absorption caractéristique des bases puriques et pyrimidiques est utilisée chaque fois que le dosage à l'orcine est impossible; l'acide trichloracétique est éliminé par lavages répétés à l'éther.

B. *Méthode de séparation des diverses fractions phosphorées:* la méthode de SCHMIDT ET TANNHAUSER²⁵ a été adoptée et utilisée à quelques détails près. Nous nous contenterons d'en rappeler ici les phases essentielles:

a. Précipitation des fractions par l'acide trichloracétique (5%) à froid: le surnageant S_1 contient tout le P acido-soluble: le P inorganique est dosé après précipitation magnésienne; le P facilement hydrolysable soluble est dosé après hydrolyse dans HCl N 7' à 100°; le P nucléotidique est dosé après minéralisation par différence avec les précédents et confirmation, soit par dosage à l'orcine soit par dosage en U.V.

b. Le culot de précipitation G_1 contient tout le P non acido-soluble. On extrait le P lipidique par plusieurs extractions successives à chaud en mélange alcool-éther; on dose après évaporation du solvant et minéralisation. Le résidu G_2 est hydrolysé 24 heures à 37° par NaOH N: l'acide ribonucléique est ainsi dépolymérisé en mononucléotides, le P des phosphoprotéines est sous forme de P inorganique: ces nucléotides et ce P se trouvent dans le surnageant S_2 où ils sont dosés: le P inorganique par précipitation magnésienne, le P nucléotidique par différence après minéralisation; on confirme à l'orcine ou en U.V. et l'on a ainsi le P ribonucléique. En réalité, à côté de ces deux formes de P, se trouve également une très petite quantité de P d'origine ribose-phosphate que l'on dose après précipitation de S_2 par 1 vol. d'acide trichloracétique à 10% acidifié par 2/10 vol. HCl 6 N: ce précipité, qui contiendrait, s'il y en avait, le P désoxyribonucléique contient du P facilement hydrolysable, dont le dosage à l'orcine confirme qu'il est d'origine ribose-phosphate.

c. Le culot résiduel G_3 contient du P non identifié dont une partie est facilement hydrolysable.

IV. RÉSULTATS ANALYTIQUES

COMPOSITION HÉTÉROGÈNE DES DIFFÉRENTS TYPES DE PLAQUETTES

A. Résultats

Nous avons groupé les résultats de nos analyses dans les trois tableaux ci-dessous. Dans le tableau I, à titre d'exemple nous donnons les chiffres obtenus au cours d'une de nos expériences valeur moyenne (pour chaque dosage effectué en triple). Les tableaux II et III comportent les chiffres moyens de trois expériences concernant d'une part les quantités de P des diverses fractions par mg de N, d'autre part les pourcentages des diverses formes de P par rapport au P total.

B. *Valeur du fractionnement:* Comme il ressort du tableau I, la concordance générale est satisfaisante; c'est ainsi que, si l'on fait la somme des différents P dosés, on retrouve avec une erreur inférieure à 5% les chiffres de la fraction globale à laquelle ils appartiennent:

Bibliographie p. 356

P acido-sol. + P lip. + P hydrolysé par NaOH + P résiduel			P _t dosé
V	267.5	γ	263 γ
G	174.75	γ	175 γ
P	62.2	γ	64 γ

Somme: des différents P acido sol. — des diff. P hydr. par NaOH			P dosé a.s.	P dosé in.s.
V	8.6 γ	208.1 γ	9.5 γ	208 γ
G	6.7 γ	135.1 γ	6.75 γ	136 γ
P	2.7 γ	57 γ	2.7 γ	57 γ

Les chiffres obtenus au cours de trois expériences différentes ne s'éloignent pas en moyenne de plus de 15% des chiffres de l'expérience rapportée ici. Dans un seul cas,

TABLEAU I
γ DE N ET DES DIFFÉRENTES FORMES DE P PAR ml DE SUSPENSION

	N _t	P _t	P _{a.s.}	P _{s.i.}	P _{7s.}	P _{s.n.}	P _{lip.}	P _{in.s.}	P _{r.n.}	P _{py.s.}	P _{l.pr.}	P _{rés.}	P _{7rés.}	P _{r.ph.}
V	2085	263	9.5	6	0.1	2.5	40	208	24	0.1	185	10	1.9	—
G	1325	175	6.75	5.3	—	1.4	25	136	17	0.1	118	7	1	—
P	684	64	2.7	1	0.8	0.9	3.5	57	7	—	50	2.5	—	0.8

TABLEAU II
γ DES DIFFÉRENTES FORMES DE P PAR mg DE N DES SUSPENSIONS

	P _t	P _{a.s.}	P _{s.i.}	P _{7s.}	P _{s.n.}	P _{lip.}	P _{in.s.}	P _{r.n.}	P _{py.i.}	P _{l.pr.}	P _{rés.}	P _{7rés.}	P _{r.ph.}
V	125	5	3	0.05	1.2	19	100	11	0.05	89	4.9	0.9	—
G	132	5	3	—	1	18	102	12.5	0.07	89	5.2	0.7	—
P	93	4	1.5	1.2	1.3	5	83	10	—	73	3.6	—	1.1

TABLEAU III
POURCENTAGES DES DIFFÉRENTES FORMES DE P PAR RAPPORT AU P TOTAL

	P _t	P _{a.s.}	P _{s.i.}	P _{7s.}	P _{s.n.}	P _{lip.}	P _{in.s.}	P _{r.n.}	P _{py.i.}	P _{l.pr.}	P _{rés.}	P _{7rés.}	P _{r.ph.}
V	100	3.7	2.3	0.04	0.95	15	79.3	9	0.04	70.6	3.8	0.7	—
G	100	3.8	2.2	—	0.76	13.8	78.5	9	0.05	68.5	4	0.6	—
P	100	4.2	1.6	1.3	1.4	5.8	89	11	—	78.5	3.7	—	1.2

LÉGENDE: V: Vitellus total; G: grandes plaquettes; P: petites plaquettes; N_t: N total; P_t: P total; P_{a.s.}: P acido-soluble total; P_{s.i.}: P inorg. acido-soluble; P_{7s.}: P facilement hydrolysable acido-soluble; P_{s.n.}: P nucléotidique vrai acido-soluble; P_{lip.}: P lipidique; P_{in.s.}: P non acido-soluble, hydrolysé par NaOH N et restant dans le surnageant de la précipitation acide trichloracétique-acide chlorhydrique; P_{r.n.}: P ribonucléique de la précédente fraction; P_{py.i.}: P pyrophosphorique de la précédente fraction; P_{l.pr.}: P phosphoprotéique de la précédente fraction; P_{rés.}: P résiduel; P₇: P résiduel facilement hydrolysable; P_{r.ph.}: P du ribose-phosphate.

nous avons obtenu des résultats aberrants; nous ne pouvons nous en expliquer la raison avec certitude; peut-être l'état d'avancement des oocytes utilisés au cours de cette expérience entre-t-il en jeu.

C. *Hétérogénéité des différentes sortes de plaquettes*: l'examen des tableaux II et III attire l'attention sur les points suivants:

a. Grande similitude entre les résultats relatifs au vitellus total V et aux grandes plaquettes G: ce fait n'a rien de surprenant et constitue même une vérification complémentaire de la bonne marche du fractionnement, puisque, si l'on admet, selon une appréciation quantitative grossière, que les quantités de substances présentes dans les plaquettes sont fonction de leurs dimensions, on peut aisément apercevoir que, d'après la seule répartition des plaquettes entre les différentes tailles, — les grandes plaquettes constituent plus de 80% du matériel vitellin en général.

b. Existence de différences très notables entre grandes et petites plaquettes, dont les plus importantes concernent:

— le chiffre global de P: celui-ci est nettement plus faible chez les petites que chez les grandes plaquettes;

— la diversité des différentes sortes de P présent: les grandes plaquettes apparaissent comme des organites beaucoup plus hétérogènes que les petites; celles-ci contiennent en effet près de 90% de leur P sous forme de P nucléo- et phosphoprotéique, alors que les grandes plaquettes en contiennent moins de 80%*; par contre le chiffre de P lipidique est notablement plus faible chez les petites plaquettes: moins de 6% au lieu de 13.8%; cette dernière observation est de quelque importance: en effet, à la suite des travaux de HOLTRETER¹⁴, une confusion fâcheuse s'est produite entre lipochondries et petites plaquettes, qui a pu même conduire certains auteurs à nier l'existence de ces dernières; nos résultats montrent qu'en réalité, petites plaquettes et lipochondries sont bien distinctes: les lipochondries sont centrifugées sous forme du gâteau lipidique éliminé dès le début et quant aux "contaminations" éventuelles des plaquettes, — et notamment leur adsorption au niveau des grandes plaquettes —, les lavages répétés les éliminent en presque totalité (la parfaite régularité de forme des grandes plaquettes et la rareté même des figures "ampoulées" décrites par HOLTRETER constituent une vérification microscopique directe de ce fait).

D. *Valeur générale des résultats*: la notion d'hétérogénéité biochimique entre les différentes sortes de plaquettes semble avoir valeur générale, du moins chez les Amphibiens; nous avons, en effet, effectué des séparations analogues entre grandes et petites plaquettes chez *Rana fusca* et chez l'*Axolotl*, sans cependant poursuivre l'analyse détaillée. Voici les résultats obtenus pour le N total et le P total: (chiffres moyens de 3 et 2 expériences).

		N _t (γ/ml)	P _t (γ/ml)	γ de P par mg de N
<i>Rana fusca</i> (gros oocytes)	V:	483	70	145
	G:	644	94	146
	P:	227	21	96
<i>Axolotl</i> (œufs fécondés)	V:	199	24	121
	G:	370	46	124
	P:	178	18	101

* Les observations faites par JENKINSON¹⁶ et confirmées par BRACHET⁵ relatives au contenu ribonucléique du vitellus se trouvent donc ici pleinement vérifiées.

On voit donc que l'on retrouve bien ici des chiffres du même ordre que ceux obtenus avec *Rana esculenta*.

E. *Données complémentaires sur l'hétérogénéité chimique des plaquettes*: nous avons cherché à examiner par une autre voie de quelle nature pouvait être cette hétérogénéité de composition entre les différentes sortes de plaquettes. A cet effet, nous avons repris la vieille expérience de FAURÉ-FREMIET ET DU VIVIER DE STREEL¹⁰ qui ont eu le mérite d'aborder les premiers dans un excellent travail l'étude biochimique du vitellus. Ces auteurs ont en effet montré qu'une proportion importante du vitellus était soluble en soude diluée et que cette fraction soluble était riche en P, alors que la fraction insoluble était au contraire fortement enrichie en S. Nous avons donc dosé le P des fractions solubles en soude N/20 en partant des mêmes préparations de plaquettes dont l'analyse détaillée est donnée dans le tableau I. Les résultats sont les suivants: (de P par ml de suspension; mêmes notations que précédemment).

TABLEAU IV

	P _t	P _{in.s.}	P _{sol.} dans NaOH N/20	% P _{sol.} /P _t	% P _{sol.} /P _{in.s.}
V	263	208	174	66	83
G	175	136	130	69	95
P	64	57	32	50	56

Il apparaît donc bien ici qu'au niveau même des nucléo- et phospho-protéines se situe une différence de constitution essentielle entre petites et grandes plaquettes: au lieu que la quasi-totalité des nucléo- et phospho-protéines des grandes plaquettes est aisément soluble en solutions alcalines, seule une fraction en est soluble dans les petites plaquettes; on peut vérifier d'ailleurs, par la réaction à l'orcine, que c'est surtout la fraction nucléoprotéique qui est soluble chez les petites plaquettes et que par contre la plus grande partie du matériel non alcalino-soluble est de nature phospho-protéique. Ces observations confirment donc bien la notion d'une hétérogénéité profonde de composition entre les deux catégories de plaquettes, hétérogénéité qualitative tout autant que quantitative. Notons encore, que, dans une même perspective, il est normal de s'attendre ici à ce que le décalage des pourcentages soit plus grand dans la fraction vitellus total, par suite de l'existence de l'important décalage des petites plaquettes composantes, — décalage non entièrement comblé par les grandes plaquettes qui s'y trouvent.

F. *Variabilité accidentelle dans la composition du vitellus*: au cours des opérations de fractionnement deux circonstances accidentelles peuvent se produire qui risquent de modifier profondément la composition du vitellus; la première a lieu lorsqu'on néglige de pratiquer sur le vitellus témoin V les centrifugations, décantations et remises en suspension effectuées sur le vitellus servant au fractionnement. Il suffit alors, en chaque cas, de centrifuger suffisamment (2 500 t/m pendant 5' pour NaCl; — 12 000 t/m pendant 10' pour le sucrose) pour être sûr de faire tomber tout le vitellus; mais à défaut des ces précautions, on observe une surcharge notable en P lipidique qui peut atteindre jusqu'à 25% des quantités usuelles; il est vraisemblable qu'il s'agit là d'une adsorption d'éléments lipochondriaux, éliminés par les lavages répétés. Nous nous sommes assuré

que, après 5 à 6 lavages, le chiffre de P lipidique restait constant, les grandes plaquettes conservant leur forme régulière au microscope.

Le second accident a lieu lorsqu'on omet de conserver le vitellus témoin à température suffisamment basse (0° au moins). On observe alors une chute du P phosphoprotéique (jusqu'à 30% en 24 heures) accompagnée d'un enrichissement considérable en P inorganique (500 à 600%). Il s'agit évidemment là d'un procès d'hydrolyse spontané du type de ceux sur lesquels nous allons revenir. Il est aisé d'y parer en travaillant à froid et en prenant la précaution complémentaire de stocker V dans le sucrose 15% pendant les intervalles d'attente du fractionnement.

V. DISTRIBUTION ET MODALITÉS D'ACTION DE LA PHOSPHOPROTÉINE PHOSPHATASE

La nette différence de constitution entre petites et grandes plaquettes confirme dans une certaine mesure la notion cytochimique d'une "organisation" du vitellus, radicalement incompatible avec l'ancienne conception d'un vitellus "inerte", simple matériel de réserve dénué de toute activité; il est clair, en effet, que, des petites aux grandes plaquettes, cette hétérogénéité chimique marque qu'il se produit une évolution vers la complexité croissante.

Les observations de BRACHET⁵ et les expériences de HARRIS¹² concernant les procès enzymatiques d'hydrolyse des phosphoprotéines, — dont nous venons de rapporter ci-dessus un exemple d'hydrolyse spontanée — prennent dans ces conditions une signification nouvelle. Il est évident, en effet, d'après l'importance même des quantités de P libéré par hydrolyse spontanée du vitellus, que ce procès doit affecter au premier chef les grandes plaquettes. On peut se demander alors si, dans cette perspective, il existe une différence d'activité enzymatique entre grandes et petites plaquettes.

Nous avons d'abord essayé, pour éviter la surcharge en P due à l'hydrolyse des plaquettes mêmes, d'en extraire une fraction hydrosoluble active. Ces essais n'ayant pas donné de résultats satisfaisants, nous avons effectué le dosage en mettant en contact les suspensions de vitellus contre une solution de caséine.

TECHNIQUE: dans chaque tube à centrifuger, $\frac{1}{2}$ ml de suspension de chiffre de N connu, $\frac{1}{2}$ ml de tampon acétate pH 5.6 0.2 M, $\frac{1}{2}$ ml de solution aqueuse de caséine Merck à 0.1%; une série de témoins sont préparés où $\frac{1}{2}$ ml d'eau remplace soit la suspension, soit la caséine. Après différents essais d'orientation, le temps d'incubation a été fixé à 18 h, à 20° C. Après incubation, on ajoute $\frac{1}{2}$ ml d'acide trichloracétique à 20%. Après une demi-heure à la glacière, on centrifuge, on dose le P dans le surnageant par la méthode de BERENBLUM ET CHAIN¹.

Les résultats sont les suivants, par mg de N de chacune des suspensions utilisées:

	V	G	P
γ de P libérés:	77	30	112

Il semble donc bien que l'enzyme se trouve principalement concentré au niveau des petites plaquettes. Toutefois, il s'en trouve également une quantité non négligeable au niveau des grandes et l'on ne peut décider s'il s'agit d'une activité intrinsèque de celles-ci ou d'une simple adsorption ou de la part prise par les petites plaquettes encore présentes dans la fraction G. Quoiqu'il en soit, il n'est pas douteux que la majeure partie de l'activité se trouve concentrée au niveau des petites plaquettes: celles-ci joueraient donc le rôle le plus actif dans le cadre de l'organisation générale du vitellus et cette idée nous paraît également trouver quelque vérification dans les expériences

de contrôle que nous avons faites au début de nos expériences sur les liquides de mise en suspension des grandes plaquettes: alors que l'hydrolyse spontanée du vitellus total, — où les petites plaquettes voisinent avec les grandes, — est extrêmement importante, celle des grandes seules reste toujours beaucoup plus faible.

VI. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1. Ces divers résultats permettent, nous semble-t-il, de préciser en quelque mesure les observations d'ordre cytochimique rapportées plus haut. D'une part, certes, la filiation entre petites et grandes plaquettes déjà démontrée par l'analyse cytologique, ne saurait être mise en doute; mais d'autre part, il apparaît désormais avec évidence que ce procès ne consiste pas seulement en un simple changement de taille: il s'agit en réalité de toute une évolution vers la complexité croissante, partant d'organites de composition assez homogène pour aboutir à des organites nettement différenciés; alors que les petites plaquettes sont pour 90% de nature protéique, les grandes plaquettes sont lipido-protéiques; encore, bien entendu, serait-il nécessaire de faire l'analyse des glucides et de poursuivre à propos des composés soufrés une étude analogue à celle qui vient d'être faite à propos des éléments phosphorés.

Une comparaison fructueuse peut s'établir, semble-t-il, avec les éléments ultra-microscopiques sédimentables du cytoplasme étudiés par CLAUDE⁸, BRACHET^{4, 5, 6}, JEENER⁶⁻¹⁵ etc. On sait, en effet, que CLAUDE a classé ceux-ci en deux grandes catégories: les petits granules ou "microsomes", et les "gros granules" identifiés notamment aux mitochondries. Or CHANTRENNE⁷ a pu démontrer que l'utilisation des méthodes de centrifugation ne permettait pas de conclure à l'existence *naturelle* de telles catégories tranchées: les vitesses et les temps de centrifugation sont, en effet, choisis *arbitrairement* et définissent successivement des organites de composition et de nature différentes; dans ces conditions, deux solutions différentes peuvent être proposées au problème posé par la constitution des granules: ou bien, comme le soutient CLAUDE, l'on attribue à chacune des deux catégories de granules une fonction caractéristique définie, un rôle physiologique et morphologique défini et l'on est conduit à admettre que les "gros granules" résultent de l'association d'un certain nombre de microsomes, — ou bien, ainsi que l'impliquent les expériences de CHANTRENNE, — l'on considère que la cellule est le siège d'un procès continu d'enrichissement autour d'un "germe" nucléoprotéique, par quoi les granules tendent à se compliquer progressivement de fonctions et de constituants nouveaux, sans que des catégories définies puissent être établies.

Il nous apparaît que les expériences effectuées sur le vitellus peuvent apporter ici quelque clarté; les opérations de centrifugation des granules cytoplasmiques sont, en effet, effectuées à l'aveugle*; dans le cas du vitellus, au contraire, le contrôle visuel accompagne constamment les étapes du fractionnement. Il est possible alors de concevoir que les conditions de séparation, sont, toutes choses égales d'ailleurs, analogues dans le cas des granules et dans celui des plaquettes. Entre grandes et petites plaquettes existent, nous l'avons vu, des plaquettes de taille intermédiaire, d'ailleurs impossibles à séparer, pour des raisons mécaniques, en se fiant à la seule définition des conditions

* CHANTRENNE⁷ a cependant pris soin de rechercher à l'ultra l'aspect de diverses fractions: mais, en cette circonstance même il s'agit en réalité d'une observation plus que d'un contrôle; les fractions centrifugées sont "acceptées" et leur aspect microscopique ne commande nullement l'expérimentation.

de centrifugation: ceci est, à n'en pas douter, l'image d'une continuité amplement démontrée à l'échelon submicroscopique par les expériences de CHANTRENNE. Toutefois, il n'en reste pas moins que la répartition des plaquettes s'effectue dans l'ensemble entre deux maxima seulement, et l'on est ainsi fondé à parler de deux catégories de plaquettes. C'est par là, pensons-nous, que l'on peut songer à retrouver les résultats de CLAUDE. A ces tailles moyennes, ainsi "catégorisées" correspondent d'ailleurs une certaine structure caractéristique (sphéricité des "petites", parallélipédisme des "grandes") et, comme nous venons de le voir, une constitution et une activité particulières.

2. On est amené alors à penser que, dans le déroulement continu de la vie cellulaire, les organites, visibles ou non, sont le siège de procès de complication progressifs d'ordre essentiellement quantitatif et amenant à des seuils qualitatifs discontinus: on peut admettre ainsi qu'il existe des conditions de stabilité maxima pour les granules invisibles, tout comme il est visible qu'il en est pour les plaquettes vitellines, conditions qui pourraient résulter de réarrangements internes des constituants se produisant à des degrés d'association bien définis, à des seuils de complication bien déterminés.

Dans cette perspective, on est conduit à se demander si de tels procès ne jouent pas non plus pour relier en somme de façon ou d'autre les éléments vitellins aux granules cytoplasmiques; il y aurait ainsi, non seulement filiation entre petites et grandes plaquettes, mais aussi peut-être entre petites plaquettes et granules cytoplasmiques. Nous avons pensé que l'existence de la phosphoprotéinephosphatase qui semble bien correspondre à une activité enzymatique bien définie et relativement spécifique pourrait ici fournir un moyen d'approche; nous avons donc dosé les différents granules cytoplasmiques pour une telle activité. Nous extrayons d'un travail en cours effectué en collaboration avec REBUFFAT ET SHAVER²⁴ quelques chiffres significatifs:

Expériences effectuées sur petits oocytes (chiffres moyens de 3 expériences) (début de vitellogénèse)

	γ Acide Ribonucléique/mg de N	Activité protéinephosph. /mg de N (γ de P libérés)
Gros granules	1.461	43
Moyens et petits granules	2.930	222
Surnageant	963	9

Des chiffres comparables se retrouvent à d'autres stades de l'ovogénèse. Il est très probable que la phosphoprotéine phosphatase intervient dans l'attaque du vitellus lors de l'embryogénèse. LEHMANN¹⁸ et BRACHET (observations non publiées) ont signalé, en effet, que le vitellus est attaqué d'abord dans les zones riches en granules basophiles. Mais rien n'interdit de penser que cette coexistence d'un même enzyme si particulier au niveau d'éléments si différents signale dans une certaine mesure une filiation structurale et fonctionnelle. Au demeurant, les observations que nous avons rapportées concernant le comportement chimique des fractions nucléo- et phosphoprotéiques ne suggèrent-elles pas que l'acide sérine-phosphorique, — dont les travaux de LIPMANN¹⁹ et surtout de POSTERNACK²⁵ indiquent qu'il renferme la quasi-totalité du P retrouvé dans les phosphoprotéines, — puisse cependant être intéressé par des systèmes de liaisons variables suivant les divers types de phosphoprotéines. Rappelons d'ailleurs ici que, d'une part, comme FEINSTEIN ET VOLK¹¹ l'ont montré, la phosphoprotéine phosphatase n'attaque pas l'acide-sérine phosphorique, et, d'autre part, qu'un travail récent de MECHAM ET OLCOTT²¹ a permis l'isolement à partir du jaune d'œuf d'une phospho-

protéine pure ayant 10% de P, dont la majeure partie sous forme d'acide sérine-phosphorique. On peut penser que ces possibilités de variation des phosphoprotéines contribuent notamment à faire des petites plaquettes des organites de composition homogène mais présentant une suffisante plasticité structurale. C'est, là encore, nous semble-t-il, un point de rapprochement de quelque intérêt avec les granules cytoplasmiques mis en évidence par l'emploi des méthodes de centrifugation, grâce à quoi s'éclairent quelque peu les observations cytochimiques qui font apparaître, tant dans la vitellogénèse que dans la différenciation, des rapports constants entre basophilie et plaquettes vitellines.

Ce travail a été effectué durant un séjour au Laboratoire de Morphologie animale et de Physiologie cellulaire de la Faculté des Sciences de l'Université libre de Bruxelles poursuivi grâce à une bourse d'échanges des chercheurs franco-belges.

RÉSUMÉ

La séparation des plaquettes vitellines des œufs d'Amphibiens est effectuée par l'emploi d'une méthode alternant centrifugations lentes et décantations en solutions de NaCl isotonique et de sucrose 33%. Deux catégories différentes, les petites et les grandes plaquettes, peuvent être ainsi caractérisées. Analysées pour leurs composés phosphorés et leur activité phosphoprotéine-phosphatase, elles apparaissent comme sensiblement différentes. Les rapports avec les granules cytoplasmiques séparables par centrifugation différentielle sont discutés. Diverses observations tendent à faire admettre une certaine diversité dans la structure des phosphoprotéines entrant dans la composition des plaquettes. Les petites plaquettes apparaissent ainsi comme des organites dotés d'une activité et d'un rôle important dans l'ovogénèse et l'embryogénèse.

SUMMARY

The separation of the vitelline platelets of amphibian eggs has been effected by employing a method which consists alternately of slow centrifuging and decanting of solutions in isotonic NaCl and in 33% sucrose. In this manner two different kinds of platelets, small and large can be characterized. They appear to be markedly different from one another when analyzed for their content of phosphorus compounds and their phospho-protein-phosphatase activity. The similarity with the cytoplasmic granules which can be separated by differential centrifuging is discussed. Various observations lead to the recognition of a certain diversity in the structure of the phosphoproteins composing the platelets. Thus the small platelets seem to be small organs endowed with a certain activity and playing an important part in ovogenesis and embryogenesis.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Vitellinscheibchen von Amphibieneiern wurden durch abwechselndes langsames Zentrifugieren in einer isotonen Lösung von NaCl mit 33% Saccharose abgeschieden. Man kann auf diese Weise zwei Arten von Scheibchen, kleine und grosse, unterscheiden. Die Bestimmung der Phosphorverbindungen und der Phosphoproteinphosphatase-Aktivität in diesen beiden Arten von Scheibchen zeigt bedeutende Unterschiede. Das Verhältnis zu den Protoplasma-Körnchen, die durch Differential-zentrifugieren getrennt werden können, wurde erörtert. Verschiedene Beobachtungen weisen darauf hin, dass Unterschiede in der Struktur der Phosphoproteine bestehen, welche die Scheibchen aufbauen. Die kleinen Scheibchen erscheinen so als kleine Organe, die eine gewisse Aktivität besitzen und die in der Ovogenese und in der Embryogenese eine wichtige Rolle spielen.

Bibliographie p. 356.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ I. BERENBLUM AND E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 286.
- ² J. BRACHET, *Arch. Biol.*, 51 (1940) 167.
- ³ J. BRACHET, *Arch. Biol.*, 53 (1942) 207.
- ⁴ J. BRACHET, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 12 (1947) 18.
- ⁵ J. BRACHET, *Embryologie Chimique*, Masson (Paris) 1945.
- ⁶ J. BRACHET ET R. JEENER, *Enzymologia*, 11 (1944) 196.
- ⁷ H. CHANTRENNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 437.
- ⁸ A. CLAUDE, *J. Exptl Med.*, 84 (1946) 51.
- ⁹ J. DAVIDSON AND C. WAYMOUTH, *Biochem. J.*, 38 (1944) 39.
- ¹⁰ E. FAURÉ-FREMIET ET DU VIVIER DE STREEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 3 (1921) 476.
- ¹¹ R. FEINSTEIN AND M. E. VOLK, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 339.
- ¹² D. L. HARRIS, *J. Biol. Chem.*, 165 (1946) 541.
- ¹³ H. HIBBARD, *Arch. Biol.*, 38 (1928) 271.
- ¹⁴ J. HOLTFRETER, *J. Exp. Zool.*, 101 (1946) 356.
- ¹⁵ R. JEENER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 633.
- ¹⁶ J. W. JENKINSON, *Quart. J. Microscop. Sci.*, 60 (1914) 61.
- ¹⁷ M. KONOPACKI ET B. KONOPACKA, *Bull. acad. pol. sci. lettr.*, B (1926) 229.
- ¹⁸ F. E. LEHMANN, *Rev. suisse zool.*, 55 (1948) 89.
- ¹⁹ F. LIPMANN, *Biochem. Z.*, 262 (1933) 3.
- ²⁰ R. MARKHAM, *Biochem. J.*, 36 (1942) 790.
- ²¹ D. K. MECHAM AND H. S. OLCOTT, *Federation Proc.*, 7, pt. 1 (1948) 173.
- ²² J. PASTEELS, *Acta anat.*, 11 (1) (1946) 1.
- ²³ S. POSTERNACK, *Biochem. J.*, 21 (1933) 289.
- ²⁴ P. REBUFFAT, J. SHAVER ET J. PANIJEL (non publié).
- ²⁵ G. SCHMIDT AND S. J. TANNHAUSER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 83.
- ²⁶ J. A. SERRA, *Stain Technol.*, 21 (1946) 5.
- ²⁷ L. C. THOMAS, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 28 (1946) 145.

Reçu le 14 juillet 1949