

L'OVOGENÈSE CHEZ *PHASCOLOSOMA VULGARE*III. RESPIRATION EXOGÈNE ET ENDOGÈNE DE L'OVOCYTE
EFFET DE L'EAU DE MER

PIERRE H. GONSE*

Station Biologique de Roscoff, Finistère (France)

Les ovocytes, cellules susceptibles d'accumuler des quantités importantes de substances de réserve très variées, apparaissent comme un objet intéressant pour des recherches sur le mécanisme des synthèses cellulaires. Sans doute en raison de difficultés techniques, ce matériel a été cependant très peu étudié, en particulier en ce qui concerne son métabolisme respiratoire¹. Seule la physiologie des ovocytes parvenus en fin de croissance est assez bien connue ayant été étudiée à propos de la fécondation ou du développement embryonnaire^{3,4}. A des stades d'évolution plus précoces les données dont on dispose actuellement sont surtout cytologiques et histochimiques. Toutefois les travaux récents de GRANT⁵ et FICQ^{6,7}, portant sur plusieurs stades de croissance de l'ovocyte de *Rana* et d'*Asteria*, ont apporté des résultats concernant le métabolisme du phosphore et des acides aminés.

Les Sipunculides présentent l'intérêt d'avoir des ovocytes libres dans le liquide coelomique et sans enveloppe folliculaire notable. L'espèce *Phascolosoma vulgare* (Blainv.) s'est avérée favorable car les ovocytes de toutes tailles sont sphériques ce qui permet une mesure précise du volume cellulaire. Au cours de recherches préliminaires, nous avons montré que tout l'accroissement s'effectue à l'état libre et que le follicule de 3 à 4 cellules, très réduit, est transitoire⁸. Une étude cytologique et histochimique plus détaillée a décelé l'existence, pendant cette croissance, d'étapes successives auxquelles les cellules parviennent lorsqu'elles atteignent des tailles bien déterminées⁹. La croissance, dont la durée totale paraît être de plusieurs mois, est bloquée en hiver à un stade précis. D'une façon générale la vitesse de cette croissance change lorsque la cellule passe d'une phase à la suivante¹⁰.

L'existence de tels synchronismes était une indication intéressante et, afin d'en tirer parti, nous avons cherché à étudier au point de vue métabolique des lots de cellules aussi homogènes que possible. On a donc fait appel aux micro-techniques qui permettent d'opérer sur quelques dizaines ou centaines d'ovocytes.

MÉTHODES

Préparation du matériel

Les phascolosomes sont ouverts par la partie postérieure et le liquide coelomique est recueilli dans une salière. Un animal de taille moyenne contient environ 1 ml de liquide très chargé en

* Adresse actuelle: Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, Paris.

éléments figurés. Les érythrocytes sédimentent moins vite que les ovocytes et peuvent donc être en partie éliminés: on aspire à la pipette le surnageant et on remet en suspension à plusieurs reprises dans du liquide frais. Les ovocytes s'étant rassemblés au fond de la salière, on en transporte une certaine quantité à l'aide d'une pipette dans une salière propre contenant un peu de liquide. Dans ce mélange de cellules, on trouve, à côté des ovocytes, encore de nombreux érythrocytes, des leucocytes, des urnes et des vésicules. On y prélève avec une pipette freinante, sous la loupe binoculaire (gross. 50 à 100), des cellules reproductrices de la taille voulue et on les rassemble dans une troisième salière. Les différences d'aspect et de coloration existant entre ovocytes de taille très voisine mais de stade déjà différent facilitent grandement cette sélection. Toujours avec la pipette freinante, on retire alors progressivement les ovocytes les plus gros et les plus petits jusqu'à obtenir un lot sensiblement homogène de cellules. Ce groupe d'ovocytes est maintenant transféré dans une lame creuse et placé sous le microscope (gross. 350) pendant un temps aussi bref que possible; on mesure ainsi le diamètre d'un certain nombre de cellules, puis on les replace dans la salière. On obtient assez aisément des lots d'ovocytes à l'intérieur desquels l'écart maximum des diamètres est inférieur à $10\ \mu$. Compte tenu de l'erreur sur les mesures, si v est le volume moyen définissant le lot, les valeurs individuelles sont comprises dans $v \pm 20\%$. Les cellules sont dénombrées juste avant d'être placées dans le ludion.

Lorsque les expériences doivent être effectuées sur des ovocytes placés dans de l'eau de mer, on peut renouveler les décantations préliminaires jusqu'à obtenir des ovocytes pratiquement débarrassés de toutes autres cellules. Dans ce cas les éléments figurés perdent les propriétés adhésives qu'ils manifestent en présence de plasma et qui entraînent souvent l'obturation des pipettes freinantes.

Si les cellules doivent être laissées constamment dans du plasma, les opérations sont un peu plus délicates. En effet on ne peut guère disposer de plus de 4 à 5 ml de plasma pur préparé à partir de quelques femelles et débarrassé de toutes cellules par centrifugation. La sélection des ovocytes dans le liquide coelomique s'effectue alors par transferts successifs de salière en salière dans des petits volumes de plasma pur. Il faut éviter toute concentration excessive du milieu par évaporation donc opérer rapidement et ne pas laisser les ovocytes séjourner trop longtemps dans une même goutte de plasma.

Lorsque les mesures de consommation d'oxygène sont effectuées dans un milieu différent de celui utilisé pour le tri, par exemple dans du plasma après une préparation des cellules dans de l'eau de mer, les ovocytes séjournent dans le plasma pendant les deux heures précédant l'expérience. En outre, juste avant le remplissage du ludion, ils sont transférés dans un nouveau volume de plasma pur.

Mesures

Les mesures de consommation d'oxygène se font par la technique du microludion dans des ludions à bouchon dont le volume d'air sensible est de 0.5 à 1.5 μ l. Les cellules reposent sur le ménisque air-milieu de culture. La solution d'équilibration qui se trouve à l'extrémité opposée de la bulle d'air est isotonique par rapport au plasma et à l'eau de mer (NaCl et NaOH 0.51 M). Toutes les mesures ont été effectuées à 18° C et pendant des périodes de 4 à 5 heures. Le type de ludion utilisé, sa fabrication et son remplissage ainsi que les calculs nécessaires à l'établissement des résultats ou à l'appréciation des erreurs, sont exposés d'autre part¹¹. L'erreur globale technique est de 5 % environ, certainement inférieure à l'erreur possible dans l'estimation du volume moyen du lot de cellules en expérience et parfois dans leur dénombrement (ovocytes en amas).

Les milieux de culture, plasma ou eau de mer filtrée, ont été testés à plusieurs reprises dans des ludions. On a constaté ainsi qu'aucun développement bactérien ne venait interférer avec les mesures de consommation d'oxygène pendant la durée habituelle des expériences. Afin d'obtenir des variations de la pression d'équilibration des ludions de 20 à 30 mm/heure, il faut placer 10 à 500 cellules en expérience selon leur taille et l'intensité de la respiration attendue. Même dans le cas d'une charge de plusieurs centaines d'ovocytes, le ménisque offre une surface très suffisante pour la dispersion des cellules, sans entassement susceptible de nuire à la diffusion des gaz. Trois ludions sont généralement mis simultanément en expérience.

Aussitôt après leur sortie du thermostat, les ludions sont rincés à l'eau de mer et la bulle d'air est calibrée; les cellules sont reprises dans une pipette et rassemblées dans une lame creuse. Sous le microscope, elles sont alors recomptées et leur état est vérifié. A la suite d'expériences sur de très petits ovocytes, on retrouve en général un certain nombre de membranes cellulaires correspondant à des cellules éclatées. Si le liquide d'équilibration est bien isotonique, le pourcentage d'ovocytes lésés est minime (1 ou 2 %).

La consommation d'oxygène est calculée d'après la variation de la pression d'équilibration par heure et rapportée à l'unité de volume cellulaire ($10^{-8}\ \mu$ l). Des corrections sont effectuées pour tenir compte des différences de température et de pression entre le thermostat et le laboratoire, ainsi que de l'évolution à vide du ludion pendant la durée de l'expérience (—0.5 mm/heure).

RÉSULTATS

Respiration exogène

On entend par respiration exogène la respiration maximum des ovocytes dans des conditions normales, c'est à dire en présence de la solution équilibrée en substrats et cofacteurs dans laquelle se réalise la croissance de ces cellules. Les ovocytes ont donc été triés dans du plasma coelomique de phascolosome femelle sans jamais être en contact avec de l'eau de mer, et leur respiration a été mesurée en présence de plasma¹². Le résultat obtenu est représenté par la courbe (R) (Fig. 1). On remarque l'existence de deux périodes à consommation d'oxygène accrue qui correspondent précisément à des stades cytologiques définis.

Respiration endogène

Les cellules ont été triées dans l'eau de mer, et une fois isolées y ont séjourné pendant deux heures avant l'expérience. On considère que dans ces conditions les cellules ne se trouvent plus en présence d'aucun substrat organique et oxydent des métabolites internes. Immédiatement avant le remplissage du ludion les cellules sont lavées encore une fois, afin d'éliminer les substances qu'elles auraient pu laisser diffuser dans le milieu. Leur état physiologique paraît stable pendant les 5 ou 6 heures d'expérience, car la pression d'équilibration des ludions varie de façon linéaire avec le temps. On note parfois un léger accroissement de la respiration à la fin des expériences.

Un certain nombre de mesures ont été effectuées en Décembre et Janvier (courbe h_1 , Fig. 1) et Février (courbe h_2 , Fig. 1). Pendant cette période dite "d'hiver" selon notre terminologie¹⁰, les animaux ne contiennent que des ovocytes de volume inférieur à $15 \cdot 10^{-5} \mu\text{l}$. Au mois de Mars ou Avril, la croissance cesse d'être bloquée et on voit apparaître dans certains animaux des cellules de volume un peu supérieur à $20 \cdot 10^{-5} \mu\text{l}$ et de coloration plus foncée due à la formation d'inclusions lipidiques. Nous avons

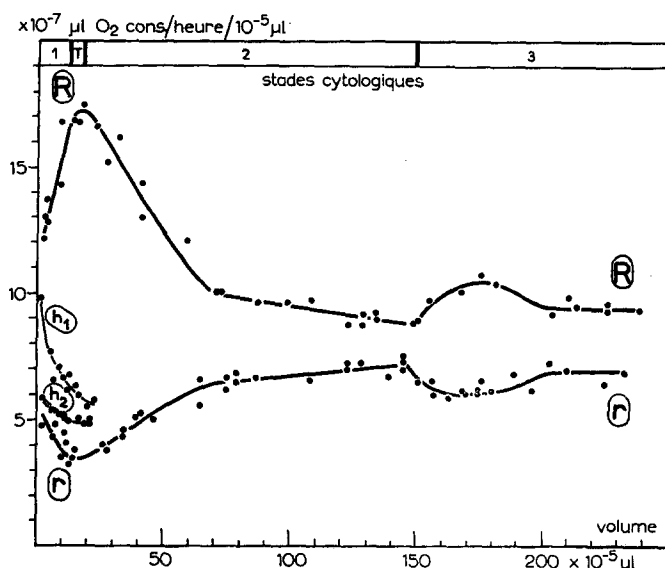


Fig. 1. (R) : Respiration exogène des ovocytes dans le plasma coelomique. (r) : Respiration endogène dans l'eau de mer. (h_1) et (h_2) : Respiration endogène anormale des petits ovocytes libérés en hiver.

observé que chez ces animaux la respiration endogène des petits ovocytes est sensiblement plus basse, et ce, d'autant plus que les cellules en début de stade 2 sont plus nombreuses. Très rapidement, en Avril, la respiration endogène atteint les valeurs inférieures (courbe r , Fig. 1) et, pour une taille déterminée, reste stable jusqu'à l'hiver suivant. On doit donc considérer les valeurs des courbes (h_1) et (h_2) comme anormales et reflétant un état physiologique particulier aux petits ovocytes libérés dans le coelome en automne et en hiver. A cette époque ces cellules sont d'ailleurs incapables de passer aux stades T et suivants. Il faut l'intervention de facteurs actuellement inconnus, liés au changement de saison, pour déclencher une transformation de ces ovocytes d'hiver leur permettant de poursuivre leur développement. La température de l'eau de mer dans les bacs d'élevage ou dans la nature est en hiver de 7 à 9° C, au printemps de 10 à 12° C, et en été de 15 à 17° C. Les ovocytes jeunes sont émis par l'ovaire toute l'année et donc en été vraisemblablement sous leur forme normale. L'existence de cellules physiologiquement aberrantes est donc limitée à une courte période de l'année et peut être négligée dans ce qui suit. On considérera uniquement la courbe (r) valable pour les ovocytes émis à une époque favorable et effectuant leur croissance normalement.

Nous n'avons pas mesuré la respiration exogène (R) des petits ovocytes d'hiver; la courbe (R) ne concerne que des ovocytes normaux et peut donc être comparée à la courbe (r).

L'eau de mer, d'autre part, détermine souvent l'activation des ovocytes de taille maximum allant jusqu'à la formation d'asters. Ce phénomène s'est donc produit à plusieurs reprises dans les ludions au cours de mesures de la respiration endogène sans que l'on note cependant une variation corrélative de la consommation d'oxygène.

Rapports entre la respiration exogène et la respiration endogène

On remarque immédiatement (Fig. 1) l'évolution opposée de la respiration exogène (R) et de la respiration endogène (r): lorsque l'une de ces variables augmente l'autre diminue et inversement. L'existence probable d'une relation liant ces deux valeurs apparaît plus nettement si l'on porte (r) en fonction de (R) (Fig. 2). Etant donné l'intérêt général de cette notion, nous avons soumis ces résultats à un traitement statistique destiné à vérifier la linéarité de cette relation et le degré de signification de la corrélation. Ces calculs ont été effectués en suivant les indications de CHAMBERS¹³, FISHER¹⁴, et PEARL¹⁵.

La plupart des mesures de consommation d'oxygène en présence de plasma et d'eau de mer n'étant pas couplées, nous avons eu recours au procédé suivant pour obtenir des couples de valeurs: à l'intérieur de chacune des deux séries de déterminations, on joint les points expérimentaux successivement les uns aux autres. Les points expérimentaux d'une série sont alors associés aux valeurs correspondantes trouvées sur les droites joignant les points de l'autre série. On obtient ainsi au total 54 couples de valeurs. Ce procédé d'interpolation permet, sans accroître l'erreur due à la dispersion des valeurs, d'éviter toute intervention subjective.

Nous avons observé une certaine constance du produit $R \times r$ ce qui semblait indiquer la possibilité d'une relation hyperbolique. On a donc établi en premier lieu, non seulement un diagramme de (r) en fonction de (R) en coordonnées arithmétiques, mais également en coordonnées logarithmiques afin de comparer graphiquement la validité des relations:

$$aR + br = c \text{ et } \log R + \log r = k$$

Dans le second cas les valeurs s'écartent si nettement d'une distribution linéaire que l'existence d'une relation hyperbolique n'a pas été retenue plus longtemps.

Le coefficient de corrélation (appelé ici q) a donc été calculé en admettant la linéarité de la régression de (r) sur (R) en valeurs arithmétiques. On trouve:

$$q = -0.901 \pm 0.025$$

La validité de la corrélation est amplement démontrée par cette valeur de ρ dont le calcul n'est toutefois valable que dans la mesure où les points ne s'écartent pas de façon significative d'une droite. On a donc calculé également le rapport de corrélation η de Pearson en groupant les 54 couples de valeurs en 10 tranches pour (R) et 9 tranches pour (r). Il vient:

$$\eta = 0.960 \pm 0.060$$

Pour comparer ρ et η on considère $\zeta = \eta^2 - \rho^2$ et l'erreur probable sur ζ calculée par la formule de Blakeman. On trouve:

$$\text{E.P. } \zeta = 0.059 \text{ et } \zeta = 0.110 \pm 0.059$$

ζ est un peu inférieur à 2 fois son erreur probable: η et ρ ne doivent donc pas être considérés comme significativement différents.

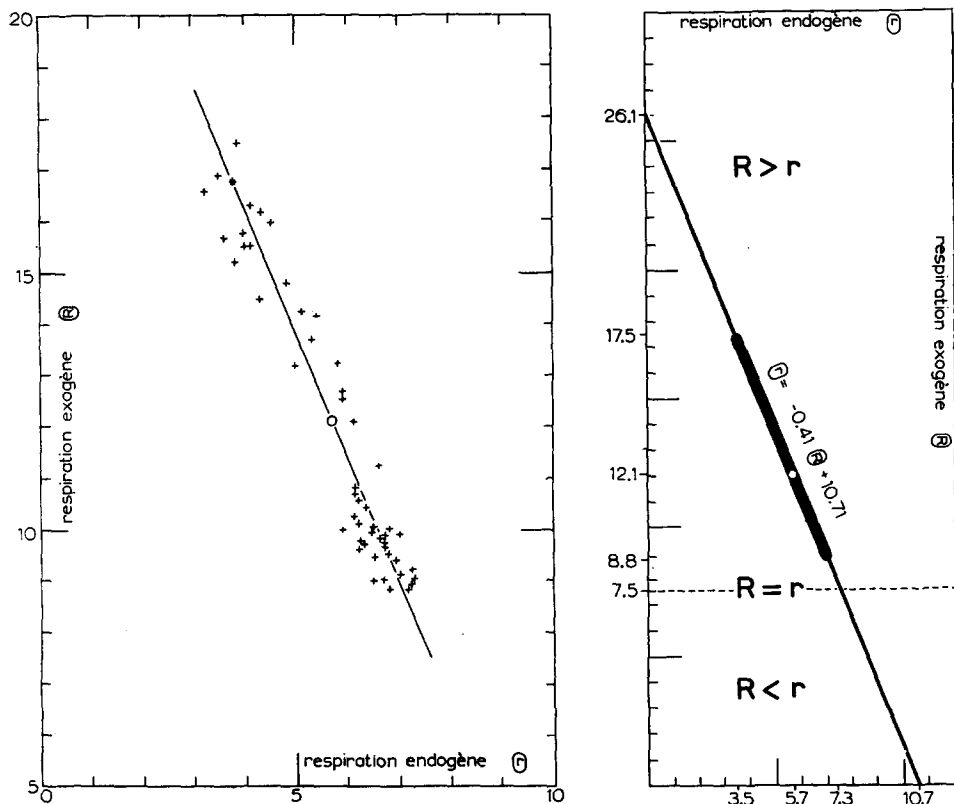


Fig. 2. Diagramme de (r) en fonction de (R). A gauche: Distribution des points expérimentaux et droite de régression moyenne. Le cercle marque l'emplacement de la moyenne. A droite: Représentation complète de la droite de régression moyenne limitée par les valeurs nulles de (r) et (R). En trait plus épais: segment parcouru par les ovocytes au cours de leur croissance.

L'association entre (R) et (r) est donc non seulement forte ($\rho = -0.901 \pm 0.025$) mais très probablement linéaire et nous sommes fondés à déterminer les pentes des droites de régression d'après ρ et les écarts types σ_R et σ_r ; on trouve -0.460 et -0.373 d'où la pente moyenne: -0.416 . La bissectrice passe par la moyenne de (R) (12.12) et de (r) (5.67) d'où:

$$(r) = -0.41 (R) + 10.71$$

équation valable à tous les stades de la croissance de l'ovocyte et donnant la valeur

de la respiration endogène en fonction de la respiration exogène. Cette équation s'accompagne évidemment des conditions restrictives suivantes:

$$(r) \geq 0 \quad \text{d'où} \quad (R) \leq 26.1$$

$$(R) \geq 0 \quad \text{d'où} \quad (r) \leq 10.7,$$

la respiration étant toujours exprimée en 10^{-7} μ l d'oxygène par heure et par 10^{-5} μ l de volume cellulaire.

L'énoncé de ces conditions pose un certain nombre de problèmes. En effet d'après la seconde de celles-ci la respiration endogène ne peut pas dépasser $10.7 \cdot 10^{-7}$ μ l, valeur qui correspond à une respiration exogène nulle. Si dans l'oeuf en voie de développement, lorsque le métabolisme endogène est pratiquement seul en cause, la respiration dépassait cette valeur, ceci indiquerait que l'équation précédente n'est plus valable.

Il existe en outre un point remarquable pour $(r) = (R) = 7.5 \cdot 10^{-7}$ μ l. Cette valeur du taux de consommation d'oxygène apparaît en effet comme une limite que les ovocytes atteindraient en fin de croissance s'ils ne subissaient pas les transformations caractéristiques du stade 3, puisqu'on l'obtient sur le diagramme 1 en prolongeant les droites représentant les respirations exogène et endogène au cours de la phase intermédiaire. C'est également la valeur de la respiration fondamentale (R.F.) pour les cellules de taille maximum (*cf.* plus loin et Fig. 3).

Dans l'ovocyte en cours de croissance et de différenciation le métabolisme respiratoire est caractérisé par une respiration exogène supérieure à la respiration endogène ($R \geq r$), l'égalité se réalisant au terme de son évolution. Par contre dans l'oeuf en voie de développement il se pourrait que la condition se renverse ($R \leq r$), mais la respiration exogène susceptible d'être provoquée par des substrats reste techniquement impossible à discerner.

Par quel mécanisme la respiration endogène se trouve-t-elle ainsi liée à la respiration exogène? Les données actuelles ne permettent pas de préciser s'il s'agit d'un phénomène général. Cependant, à titre d'hypothèse de travail, nous croyons pouvoir proposer le mécanisme suivant:

La respiration exogène (R) et la respiration endogène (r) sont respectivement sous la dépendance des systèmes enzymatiques (S) et (s). Un cofacteur est commun à ces deux systèmes et s'y trouve lié à des apoenzymes différents (A) et (a). La vitesse de renouvellement et de synthèse du coenzyme commun est telle que sa concentration totale α reste constante dans l'unité de volume cellulaire pendant toute la croissance. On a donc:

$$\alpha = c + CA + ca \quad (1)$$

avec c : concentration en coenzyme libre

CA : concentration en coenzyme lié à une protéine de (S)

ca : concentration en coenzyme lié à une protéine de (s).

Si nous admettons que la respiration est proportionnelle à la concentration en enzyme complet:

$$(R) = k_1 CA \quad \text{et} \quad (r) = k_2 ca$$

en remplaçant dans (1) il vient:

$$(r) = -\frac{k_2}{k_1} (R) + k_2 (\alpha - c)$$

Cette formule s'identifie à celle que nous avons obtenue expérimentalement si k_2 ($\alpha - c$) est constant, c'est à dire si c (concn. en coenzyme libre) est négligeable à chaque instant, ou bien si c est sensiblement égal à α . Dans le premier cas il faudrait envisager l'existence de constantes de dissociation très faibles pour CA et ca , et dans le second une concentration de coenzyme lié petite par rapport à la quantité totale de coenzyme. Dans ce dernier cas on doit se représenter les molécules du cofacteur comme un ensemble flottant en échange constant entre les apoenzymes. En définitive ce pourrait être par des modifications de la répartition statistique des molécules de coenzyme que le métabolisme oxydatif de la cellule, au cours de la croissance, s'adapterait momentanément à des processus de synthèses spéciales aux dépens des oxydations endogènes.

Respiration exogène après passage dans l'eau de mer

L'étude de la respiration endogène dans l'eau de mer a été accompagnée d'un test destiné à contrôler l'intégrité des cellules après ce traitement. Les ovocytes ont donc été triés dans l'eau de mer, y ont séjourné environ 2 heures, puis ont été replacés dans du plasma coelomique. On a constaté ainsi que la respiration exogène ne se rétablissait plus à son niveau normal au cours des stades à respiration élevée (R.F. Fig. 3). Les pics sont entièrement abolis et l'intensité respiratoire est ramenée sensiblement au niveau caractéristique de la fin du stade 2 quelle que soit la taille des cellules. Dans les conditions expérimentales, c'est à dire, pendant les 5 à 6 heures qui suivent le traitement par l'eau de mer, le phénomène est irréversible.

On constate que la droite représentant l'évolution de la respiration insensible à l'eau de mer n'est pas horizontale (R.F. Fig. 3). Nous avons pensé que cet abaissement pourrait être dû au développement progressif de la membrane vitelline qui est

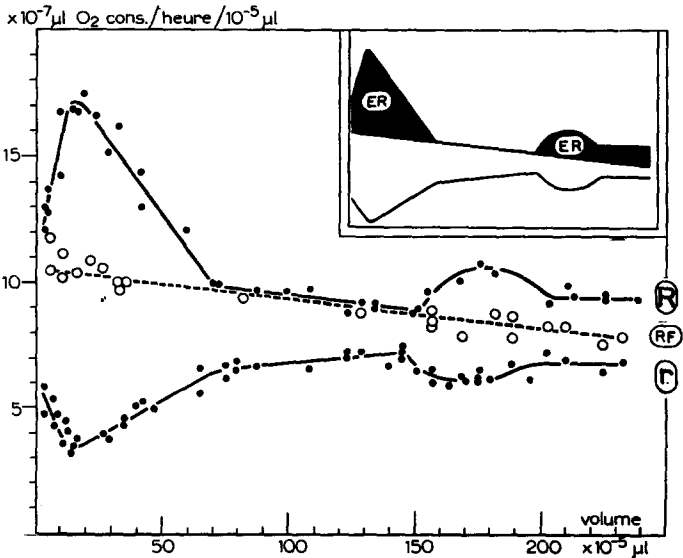


Fig. 3. (R): Respiration exogène dans le plasma. (r): respiration endogène dans l'eau de mer. Tirets et cercles, (R.F.): respiration fondamentale, dans le plasma après traitement par l'eau de mer. En haut, en noir, (E.R.): pics de la respiration exogène supprimés après le passage dans l'eau de mer.

toujours incluse dans les mesures de diamètre cellulaire et qui pourrait être physiologiquement inerte. La membrane a une épaisseur de $4\ \mu$ et représente environ 13 % du volume chez les ovocytes de grande taille. Il faudrait donc augmenter la respiration d'autant, mais cette correction est insuffisante pour compenser son abaissement graduel de $10-11$ à $7-8 \cdot 10^{-7}\ \mu\text{l}$, soit de quelques 30 %.

Le passage dans l'eau de mer aurait donc deux effets sur les cellules: d'une part les priver de substrats, d'autre part y déterminer des modifications irréversibles du métabolisme. Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de façon certaine une modification correspondante de l'aspect des cellules, sauf dans les ovocytes de grande taille et de couleur claire, donc parvenus en fin d'évolution. Dans ces cellules, en effet, le lavage prolongé par l'eau de mer provoque fréquemment l'entrée en maturation avec effacement du noyau, formation de 2 petits asters et décollement de la membrane vitelline⁹. Le phénomène est connu chez *Asteria*, *Chaetopterus*, tandis que chez *Psammechinus* le traitement par l'eau de mer accroît le taux de fécondation¹⁶. Il est possible qu'un lien existe entre le déclenchement de la maturation et la disparition irréversible d'une fraction de la respiration exogène. Ce dernier effet reste toutefois fondamental puisqu'il frappe aussi les jeunes ovocytes.

Le rôle de l'eau de mer dans cette transformation du métabolisme n'est pas encore clair et ce problème est en cours d'étude. Le milieu dans lequel sont placées les cellules est toujours isotonique; d'ailleurs un liquide hypertonique, comme le plasma concentré par évaporation, n'a jamais cet effet. La sélectivité remarquable du phénomène laisse penser qu'il est dû à la modification d'un système enzymatique plutôt qu'à une simple altération des propriétés physiques de la cellule au niveau de la membrane ou du cortex. C'est ce que semblent indiquer les recherches concernant la nature des oxydations aux divers stades de la croissance qui seront publiées ultérieurement¹⁷. D'autre part quelques mesures de consommation d'oxygène ont été faites sur des ovocytes provenant d'un même animal, triés dans du plasma pur, placés pendant 3 heures dans des solutions de plasma à différentes dilutions dans l'eau de mer, et reportés pour les mesures dans du plasma pur. Le Tableau I donne un exemple des résultats que l'on obtient ainsi:

TABLEAU I

Volume moyen des ovocytes en $10^{-8}\ \mu\text{l}$	Respiration dans du plasma pur en $10^{-7}\ \mu\text{l O}_2/\text{h}$	Dilution du plasma par l'eau de mer pendant le traitement préalable
17.5	17.0	0
17.5	12.1	$\frac{1}{2}$
17.5	10.4	$\frac{1}{4}$
17.5	10.6	∞

Le séjour des ovocytes dans du plasma dilué seulement au $\frac{1}{2}$ provoque déjà une inhibition très nette de la respiration exogène normale. L'effet du jeûne qui pourrait entraîner la disparition d'un intermédiaire du métabolisme nécessaire à la reprise complète des oxydations ne paraît pas en cause, pas plus que l'absence temporaire d'une substance protectrice du plasma comme dans le déterminisme de la maturation chez *Asteria* (HEILBRUNN et coll.¹⁸). Il semble donc que l'eau de mer a un effet propre. Celui-ci pourrait être dû à une différence de concentration de certains ions par rapport

au plasma ou à la présence d'un inhibiteur dans l'eau de mer. Les conséquences seraient soit une inhibition lentement réversible (plus de 6 heures), soit, si le phénomène est définitivement irréversible, la perte d'un système enzymatique par suite du déséquilibre ionique. Le rôle des anions et des cations dans la régulation de la glycolyse a été mis en évidence^{19, 20}, comme celui des concentrations relatives de Ca^{++} et Mg^{++} dans l'intégrité de la phosphorylation oxydative par les mitochondries²¹. L'importance du calcium a d'autre part été souvent postulée dans le mécanisme de l'activation des oeufs^{22, 23}. Il est possible qu'ici le phénomène affecte surtout les enzymes périphériques qui participent au transport, à travers la membrane, de certains substrats. Dans cette hypothèse, la perméabilité de la cellule qui a été altérée par le contact avec l'eau de mer, le resterait, après le retour de l'ovocyte dans du plasma, pendant une période assez longue nécessaire à la reconstitution des systèmes atteints.

DISCUSSION

L'interprétation des résultats obtenus sur la respiration dans les différentes conditions expérimentales a déjà été envisagée dans les paragraphes précédents. Nous nous bornerons ici à rapprocher ces données des observations effectuées au cours d'une étude parallèle de la cytologie des cellules. Un schéma général, déjà publié par ailleurs⁹, est destiné à faciliter cette confrontation et à permettre d'étendre la comparaison à d'autres travaux concernant la morphologie ou l'histochemie des ovocytes en cours de différenciation.

On remarque que les deux phases à respiration élevée sont caractérisées l'une et l'autre par une coloration plus forte du cytoplasme par la pyronine surtout dans la zone périnucléaire. On admet de façon générale que l'intensité de cette coloration est en rapport avec la quantité d'acides nucléiques présents et on attribue à l'acide ribonucléique un rôle important dans la synthèse des protéines. Nos observations sur les ovocytes de phascolosomes semblent confirmer cette relation puisque la première phase à forte respiration exogène correspond, avec quelques doutes néanmoins en raison de difficultés techniques dans leur dénombrement, à une multiplication particulièrement intense des mitochondries, tandis que la seconde correspond de façon certaine à l'apparition des plaquettes vitellines. On notera que les nucléoles ont un comportement semblable au cours de ces deux phases: leur nombre diminue brusquement au moment où la respiration atteint son maximum. Bien qu'il s'agisse d'un matériel différent et que nos données ne soient pas analytiques, ces résultats pourraient être mis en parallèle avec ceux de COMITA ET WHITELEY²⁴ qui ont montré l'existence d'une corrélation statistique entre la teneur en acide désoxyribonucléique et la respiration au cours du développement de *Strongylocentrotus*.

En stratifiant le contenu des ovocytes par centrifugation dans un milieu de même densité nous avons montré que les variations de la respiration exogène par unité de volume ne reflètent pas simplement des variations dans le pourcentage de cytoplasme présent dans les cellules²⁵. Par cette technique on a, d'autre part, cherché à évaluer volumétriquement différents éléments intracellulaires tels que: inclusions lipidiques, polysaccharides. Ces résultats ont un caractère quantitatif assez discutable mais ils montrent que ce n'est pas la formation des inclusions lipidiques qui requiert une intensité respiratoire élevée car, dans les cellules de 15 à $200 \cdot 10^{-5} \mu\text{l}$, elles se forment à un taux constant.

Les deux phases à forte respiration ont d'autres caractères communs, en particulier la présence de polysaccharide dans le cytoplasme: du galactogène, probablement, s'accumule sous forme granulaire au cours du stade 1 et du glycogène à l'état diffus apparaît au stade 3. Il est possible qu'il s'agisse là de phénomènes secondaires liés au développement d'un métabolisme spécial au cours des stades en question.

On constate enfin que le stade *T* ($15 \cdot 10^{-5} \mu\text{l}$) auquel les cellules ne peuvent pas parvenir en hiver et qui est nettement défini par la chute du nombre de nucléoles et le tassement périnucléaire du chondriome coïncide avec le maximum de la respiration exogène (Fig. 1). Rappelons que c'est à la fin de stade qu'apparaissent les premières inclusions lipidiques.

Le problème se pose de savoir si, au cours des stades à forte respiration, une partie de celle-ci est sous la dépendance d'un ou plusieurs systèmes enzymatiques spéciaux responsables des modifications intracellulaires particulières à ces stades, ou bien s'il s'agit d'une activation de l'ensemble des systèmes fonctionnant constamment dans la cellule et qui fournissent momentanément le surcroît d'énergie nécessaire à des processus de synthèse particuliers. En faveur de cette dernière théorie, unitaire, on notera que, au cours de toute la croissance, quelle que soit la forme de la courbe représentant la respiration exogène, la respiration endogène reste liée à celle-ci par une même formule. Mais il se peut que cette liaison s'effectue à un niveau terminal des oxydations, laissant toute possibilité, en amont, à des modifications des voies du métabolisme; ce que paraissent indiquer très fortement les expériences de traitement des cellules par l'eau de mer après lesquelles les pics respiratoires sont supprimés.

Il semble donc légitime de distinguer non seulement respirations endogène (*r*) et exogène (*R*), mais aussi, à l'intérieur de la respiration exogène, une "respiration fondamentale" insensible à l'eau de mer (*R.F.*) et une "extra-respiration" sensible (*E.R.*).

La respiration fondamentale (*R.F.* Fig. 3) est à peu près constante et dépend des processus qui apportent à la cellule l'énergie nécessaire à sa croissance volumétrique et au maintien de ses caractères fondamentaux (mitochondries, noyau, cytoplasme); l'énergie ainsi disponible permet également la formation d'inclusions lipidiques.

L'extra-respiration (*E.R.* Fig. 3) est due à l'activité momentanée de systèmes enzymatiques qui apportent un surcroît d'énergie et des substrats spécifiques permettant des synthèses spéciales, comme celles de certains enzymes et de protéines. Le développement de ce métabolisme particulier implique l'utilisation de voies où certaines étapes sont sensibles à l'action de l'eau de mer. Il semble que la formation de polysaccharides découle, en outre, de l'activité de ces systèmes. De tels remaniements du métabolisme sont décrit chez *Arbacia* où, après la fécondation, la glycolyse remplace progressivement la voie de Dickens antérieurement prépondérante²⁶.

Enfin, dans l'ovocyte de phascolosome, toutes les voies du métabolisme oxydatif exogène, celles correspondant à la respiration fondamentale comme celles qui correspondent à l'extra-respiration, sont, à leur terme, tributaires d'un même système déshydrogénant ou transporteur dont la capacité est limitée par son degré d'adaptation momentanée au métabolisme oxydatif endogène.

Il serait intéressant de confronter ces résultats avec ceux qui concernent la respiration d'oeufs en voie de développement, l'oeuf non fécondé ayant été souvent pris comme terme de comparaison²⁷. Mais le rapprochement est difficile car les valeurs sont très variées et les mesures ont été effectuées, presque toujours, sur des cellules

placées dans l'eau de mer donc dans des conditions où le métabolisme endogène est pratiquement seul en cause. Nos observations, comme celle de BOREI²⁸, montrent que l'ovocyte, contrairement à l'oeuf en voie de développement, est une cellule à métabolisme exogène élevé qui, dans un milieu dépourvu de substrats, se trouve dans des conditions tout à fait anormales. Chez les invertébrés marins l'état d'inertie, de diapause²⁹ de l'oeuf émis dans le milieu extérieur pourrait être dû non seulement à l'achèvement de son évolution mais aussi à un effet de l'eau de mer elle-même qui modifie et altère profondément son métabolisme.

RÉSUMÉ

On a étudié, par la technique du micro-ludion, la respiration des ovocytes coelomiques de *Phascolosoma vulgare* à tous les stades de leur croissance.

La respiration exogène (dans le plasma coelomique) montre deux pics. Chacun correspond à une période d'accumulation d'acides nucléiques, colorables par la pyronine, dans le cytoplasme. Pendant ces deux phases à métabolisme oxydatif intense il y aurait synthèse de protéines particulières et de polysaccharides.

La respiration endogène (dans l'eau de mer pure) évolue de façon opposée: elle diminue quand la respiration exogène s'accroît et inversement. La relation entre ces deux variables est linéaire et représentée par: $r = -0.41 R + 10.71$. Le coefficient de corrélation $\rho = -0.901 \pm 0.025$. La valeur générale de ce résultat reste à approfondir mais une théorie explicative est proposée.

La respiration ne se rétablit pas entièrement chez les ovocytes replacés dans du plasma après avoir séjourné dans l'eau de mer. Les deux pics sont supprimés complètement et irréversiblement pendant les 6 heures d'expérience. La spécificité de ce phénomène est si marquée qu'il semble être de nature enzymatique. Dans les gros ovocytes, l'eau de mer, en plus de cette modification physiologique, provoque l'activation et l'entrée en métaphase.

On reconnaît 3 niveaux d'oxydation: la respiration endogène, la respiration fondamentale qui n'est pas sensible à l'eau de mer, l'extra-respiration, c'est à dire les pics de respiration exogène disparaissant après traitement par l'eau de mer. On considère brièvement le rôle des conditions exogènes et endogènes vis à vis des ovocytes et des oeufs.

SUMMARY

The oxygen consumption of the coelomic oöcytes of *Phascolosoma vulgare*, at all stages of their growth, has been studied with the diver technique.

The exogenous respiration (in the coelomic plasma) shows two peaks. Each of them corresponds to a period of accumulation of nucleic acids, stainable with pyronine, in the cytoplasm. These two phases of intense oxidative metabolism seem to be coupled with the synthesis of special proteins and of polysaccharides.

The endogenous respiration (in pure sea water) behaves in the opposite manner: it decreases when exogenous respiration increases and vice versa. The relation between these two variables is linear and represented by: $r = -0.41 R + 10.71$. The coefficient of correlation $\rho = -0.901 \pm 0.025$. The general value of this result remains to be investigated but an explanatory theory is proposed.

The respiration does not recover completely in the oöcytes when they are replaced in the plasma after having been left to stand in sea water. The two peaks are eliminated completely and irreversibly during the experimental period (6 hours). This phenomenon has such a specific character that it seems to be enzymic in nature. In the biggest oöcytes sea water induces, besides this physiological change, the activation and appearance of metaphase.

Three levels of oxidation have thus been recognized: endogenous respiration, fundamental respiration, i.e. respiration resistant to sea water, and extra-respiration, i.e. peaks of exogenous respiration disappearing after treatment with sea water. The significance of exogenous and endogenous conditions in oöcytes and eggs is discussed briefly.

Bibliographie p. 278.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ K. A. METSCHERSKAYA, cité dans².
- ² J. BRACHET, *Embryologie chimique*, Masson & Cie., Paris, 1947.
- ³ J. RUNNSTRÖM, *Advances in Enzymol.*, 9 (1949) 241.
- ⁴ T. GUSTAFSON, *Intern. Rev. Cytol.*, 3 (1954) 277.
- ⁵ P. GRANT, *J. Exptl. Zool.*, 124 (1953) 513.
- ⁶ A. FICQ, *Exptl. Cell Research*, 9 (1955) 286.
- ⁷ A. FICQ, *Arch. biol. (Liège)*, 66 (1955) 509.
- ⁸ P. H. GONSE, *Compt. rend.*, 236 (1953) 528.
- ⁹ P. H. GONSE, *Acta Zool.*, 37 (1956) 193.
- ¹⁰ P. H. GONSE, *Acta Zool.*, 37 (1956) 225.
- ¹¹ P. H. GONSE ET E. ZEUTHEN, (expériences inédites).
- ¹² P. H. GONSE, *Compt. rend.*, 238 (1954) 2350.
- ¹³ E. G. CHAMBERS, *Statistical Calculation for Beginners*, Cambridge Univ. Press, London, 1948.
- ¹⁴ R. A. FISHER, *Les Méthodes Statistiques*, Presses Universitaires de France, Paris, 1947.
- ¹⁵ R. PEARL, *Medical Biometry and Statistics*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1941.
- ¹⁶ B. HAGSTRÖM, *Exptl. Cell Research*, 9 (1955) 313.
- ¹⁷ P. H. GONSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957), sous presse.
- ¹⁸ L. V. HEILBRUNN, A. B. CHAET, A. DUNN ET W. L. WILSON, *Biol. Bull.*, 106 (1954) 158.
- ¹⁹ Z. DISCHE ET G. ASHWELL, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 56.
- ²⁰ M. F. UTTER, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 499.
- ²¹ L. ERNSTER ET H. LOW, *Exptl. Cell Research, Suppl.*, 3 (1955) 133.
- ²² L. V. HEILBRUNN, *The Dynamics of Living Protoplasm*, Academic Press Inc., New York, 1956.
- ²³ L. GOLDSTEIN, *Biol. Bull.*, 105 (1953) 87.
- ²⁴ J. J. COMITA ET A. H. WHITELEY, *Biol. Bull.*, 105 (1953) 412.
- ²⁵ P. H. GONSE, *Exptl. Cell Research*, 8 (1955) 550.
- ²⁶ M. E. KRAHL, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 27.
- ²⁷ D. M. WHITAKER, *J. Gen. Physiol.*, 16 (1933) 497.
- ²⁸ H. BOREI, *Biol. Bull.*, 95 (1948) 124.
- ²⁹ P. E. LINDAHL ET H. HOLTER, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, 24 (1941) 49.

Reçu le 9 novembre 1956

UROKINASE

AN ACTIVATOR OF PLASMINOGEN FROM HUMAN URINE

I. ISOLATION AND PROPERTIES

JØRGEN PLOUG AND NIELS OLE KJELDGAARD

Leo Pharmaceutical Products, Hormone Department, Copenhagen/Skovlunde (Denmark)

INTRODUCTION

The recognition of the physiological significance of the fibrinolytic system during thrombotic conditions has promoted a growing interest in the problems concerning the formation in the blood of the fibrinolytic enzyme, plasmin, from its precursor, plasminogen. Several activators of this process have been isolated from bacteria, body fluids and tissues. The presence of an activator in human urine acting upon both human and animal plasminogen was described by WILLIAMS¹, ASTRUP AND STERN-DORFF² and GUEST *et al.*³. The activator was named "urokinase" by GUEST *et al.*

References p. 282.