

Analyse expérimentale de la différenciation embryonnaire chez les échinodermes

Par R. LALLIER*

Les travaux de HERBST, HÖRSTADIUS, LINDAHL et RUNNSTRÖM notamment ont montré la possibilité de modifier expérimentalement le développement embryonnaire de l'oursin. Le développement normal dépend de l'équilibre entre les tendances à la différenciation ectodermique d'une part et entomésodermique d'autre part. La perturbation de cet équilibre par des traitements appropriés entraîne des changements morphologiques considérables (fig. 1). Deux termes ont été créés pour représenter ces phénomènes. La végétativisation (ou végétalisation) exprime la prédominance de la différenciation des structures entomésodermiques ou végétatives. L'animalisation exprime la prédominance de la différenciation des structures ectodermiques ou animales.

Végétativisation et animalisation sont obtenues soit par des méthodes opératoires (isolements et recombinaisons de blastomères), HÖRSTADIUS¹, soit par l'action de certains agents chimiques. Depuis les recherches de HERBST sur les effets végétativisants du lithium, un grand nombre de travaux ont été consacrés à l'étude tant morphologique que physiologique de ce phénomène, et leurs résultats ont fait l'objet de revues détaillées, HÖRSTADIUS², RANZI³, GUSTAFSON⁴.

L'étude physiologique de l'animalisation est moins avancée que celle de la végétativisation. Cela résulte en partie des difficultés rencontrées pour obtenir l'animalisation suffisamment forte et régulière d'un grand nombre de larves. Ces difficultés ont été levées récemment par l'emploi de nouvelles méthodes d'animalisation⁵. Nous consacrerons cet exposé à l'étude de l'animalisation.

Dans les larves animalisées, la prédominance des structures ectodermiques sur les structures entomésodermiques s'exprime à des degrés différents, selon l'intensité de l'animalisation. Lorsque l'animalisation est très forte la touffe ciliée apicale recouvre jusqu'aux trois quarts de la surface de la blastula. L'épaississement de l'ectoderme apical est très accentué et s'étend latéralement. L'archentéron n'est pas formé (fig. 1a).

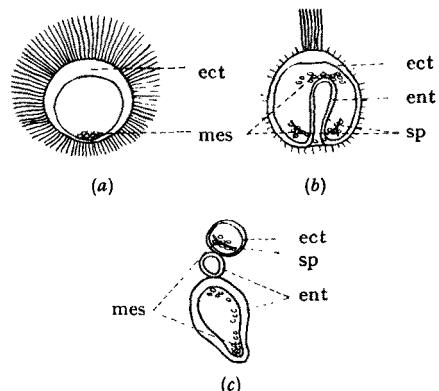


Fig. 1. Représentation schématique d'embryon d'oursin normal, animalisé et végétativisé.
a embryo animalisé. - b gastrula normale. - c embryo végétativisé.

ect. ectoderme. - ent. entoderme. - mes. mésenchyme. - sp. spicules.

Dans les larves plus âgées le revêtement ciliaire est formé de cils courts très mobiles, recouvrant toute la surface de la blastula. L'extension de la touffe ciliée apicale donne une indication sur l'intensité de l'animalisation¹. Dans les larves moins animalisées, il se différencie un champ cilié ou une bande ciliée entourant le champ oral. La bouche n'est pas formée, ni l'archentéron. Ce dernier ne se différencie que dans les larves faiblement animalisées. Nous signalerons enfin que de nombreux agents animalisants induisent le développement de formes larvaires à symétrie radiale (fig. 2).

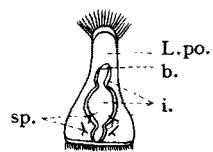


Fig. 2. Représentation schématique d'embryon d'oursin à symétrie radiale
L. po. lobe préoral. - b. bouche. - i. intestin. - sp. spicules.

* Centre National de la Recherche Scientifique. Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer (A. M.).

¹ S. HÖRSTADIUS, Pubbl. Staz. zool. Napoli 14, 251 (1935).

² S. HÖRSTADIUS, Pubbl. Staz. zool. Napoli 21 (suppl.), 131 (1949).

³ S. RANZI, Exper. 7, 169 (1951).

⁴ T. GUSTAFSON, Int. Rev. Cytol. 3, 277 (1954).

⁵ R. LALLIER, Exp. Cell Res. 8, 230 (1955); Exp. Cell Res. 9, 232 (1955).

Les méthodes chimiques d'animalisation font appel à des substances très variées.

L'animalisation a été obtenue avec le sulfocyanure^{6,7}. Les effets de ce sel sont différents selon qu'il agit avant ou après la fécondation. Avant la fécondation les effets sont animalisants; après la fécondation s'y ajoutent des effets inhibiteurs. L'animalisation par le sulfocyanure est très irrégulière. Elle varie selon les pontes et les embryons d'une même ponte présentent des différences souvent considérables. Ce phénomène serait lié à des différences de solubilité des protéines⁸. Le lithium réduit les effets du sulfocyanure⁷ tandis que le potassium les renforce⁹. L'iode de sodium est également animalisant⁷ ainsi que le perchlorate¹⁰ et le persulfate de sodium¹¹. Les effets du persulfate sont supprimés en présence d'une concentration suffisante de chlorure de lithium.

La suppression de certains ions de l'eau de mer, tels que les ions sulfate¹² ou potassium¹³ provoque l'animalisation. Le matériel entomésodermique serait plus sensible que le matériel ectodermique à l'absence de ces ions.

Des enzymes protéolytiques sont animalisants. La trypsine^{14,15} animalise les œufs entiers tandis que la ficine¹⁵ renforce l'animalisation des moitiés animales isolées.

L'animalisation a été obtenue avec les sels biliaires¹⁶. Des détergents anioniques induisent le développement de formes larvaires à symétrie radiale¹⁷.

L'action de substances participant au métabolisme normal et de certains antimétabolites a été étudiée par les embryologistes suédois. En général les effets de ces substances sont examinés sur des moitiés animales isolées, cette méthode permettant de mettre plus aisément en évidence que sur l'œuf entier de petites déviations du développement en direction animale¹⁸. Les effets animalisants sont généralement peu prononcés sur les œufs entiers.

Les substances utilisées sont des produits du métabolisme intermédiaire des glucides ou des protéines. Aux premiers appartiennent le pyruvate de sodium¹⁹, le propanediol phosphate, l'acide phosphogluconique

et l'acide lactique²⁰. Tous se sont montrés animalisants. La glutamine, qui intervient au cours du métabolisme protéique, s'est également montrée animalisante¹⁸. En constraste la plupart des acides aminés sont végétativisants ou dépourvus d'effets morphogénétiques¹⁸.

Plusieurs antimétabolites ont été étudiés. Le développement de formes larvaires à symétrie radiale a été obtenu avec la 8-chloroxanthine et l'acide β -phényllactique²¹. Une légère animalisation a en outre été observée avec la 8-chloroxanthine. Ces substances interfèrent respectivement avec le métabolisme des purines et de la phénylalanine. Un analogue de la niacine, l'acide pyridine-3-sulfonique, et un analogue de l'acide ascorbique, l'acide glucoascorbique, sont animalisants²² ainsi que le 2-thio-5-méthyl-cytosine, analogue de la cytosine²³. Les effets animalisants de ces substances présentent d'ailleurs certaines irrégularités. C'est ainsi que la 8-chloroxanthine accentue les effets végétativisants du lithium tandis qu'un analogue de la niacine, l'acide α -picolinique, se montre végétativisant. Dans ces conditions il apparaît douteux que les propriétés antimétabolites de ces substances puissent être tenues pour responsables des effets animalisants et l'intervention d'autres propriétés doit être considérée²².

L'animalisation a pu être obtenue à l'aide de différentes substances capables d'interférer avec les réactions d'oxydo-réduction. La pyocyanine pigment bleu extrait de *B. pyocyaneus*, favorise l'animalisation des larves²⁴. La thionine et le bleu de méthylène se montrent également animalisants, bien que leurs effets soient assez faibles et irréguliers^{25,26}. Sous sa forme oxydée, l'acide α -lipoïque est animalisant, la forme réduite l'étant beaucoup moins²⁷.

L'acide thiomalique ($\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CHSH}-\text{COOH}$) sous forme de sel de sodium animalise fortement les œufs entiers^{9,28}. La présence d'un groupe thiol confère à cette substance des propriétés réductrices. L'oxydation du groupe sulphydryle entraîne la perte de l'activité animalisante²⁹. D'autres substances porteuses de un ou deux groupes thiols, tels que l'acide mercaptoacétique, la β -mercaptoprothylamine et le dimercaptopropanol sont dépourvues d'activité animalisante²⁹. Les effets animalisants de l'acide thiomalique ne sont pas supprimés par le lithium; ils sont renforcés par les ions po-

⁶ J. RUNNSTRÖM, Roux' Arch. 113, 556 (1928).

⁷ P. E. LINDAHL, Acta Zool. 17, 179 (1936).

⁸ P. E. LINDAHL, B. SWEDMARK et J. LUNDIN, Exp. Cell Res. 11, 35 (1951).

⁹ R. LALLIER, Arch. Biol. 66, 223 (1955).

¹⁰ R. LALLIER, C. R. Soc. Biol. 151, 471 (1957).

¹¹ R. LALLIER, Arch. Biol. 67, 181 (1956).

¹² C. HERBST, Roux' Arch. 5, 649 (1897).

¹³ J. RUNNSTRÖM, Pubbl. Staz. zool. Napoli 6, 1 (1925).

¹⁴ A. R. MOORE, J. exp. Zool. 121, 99 (1952).

¹⁵ S. HÖRSTADIUS, J. Embryol. exp. Morphol. 1, 327 (1953).

¹⁶ R. LALLIER, C. R. Soc. Biol. 148, 1496 (1954).

¹⁷ T. GUSTAFSON et R. SÄVHAGEN, Arkiv. Zool. 42A (10), 1 (1950).

¹⁸ T. GUSTAFSON et S. HÖRSTADIUS, Pubbl. Staz. zool. Napoli 29, 407 (1957).

¹⁹ S. HÖRSTADIUS et S. STRÖMBERG, Roux' Arch. 140, 409 (1940).

²⁰ S. HÖRSTADIUS et T. GUSTAFSON, Festschr. N. von Hofsten, Zool. Bidr. Uppsala 25, 571 (1947).

²¹ S. HÖRSTADIUS et T. GUSTAFSON, J. Embryol. exp. Morphol. 2, 216 (1954).

²² T. GUSTAFSON et S. HÖRSTADIUS, Exp. Cell Res. Suppl. 3, 170 (1955).

²³ T. GUSTAFSON et S. HÖRSTADIUS, Zool. Anz. 156, 102 (1956).

²⁴ J. RUNNSTRÖM et D. THÖRNBLOM, Acta Biol. lat. 8, 97 (1938).

²⁵ E. TAMINI, Monit. zool. Ital. 52, 81 (1941).

²⁶ R. LALLIER, C. R. Soc. Biol. 149, 1198 (1955).

²⁷ J. RUNNSTRÖM, Exp. Cell Res. 11, 660 (1956).

²⁸ R. LALLIER, Exper. 8, 271 (1952).

²⁹ R. LALLIER, C. R. Acad. Sci. 238, 1347 (1954); C. R. Acad. Sci. 246, 2810 (1958).

tassium²⁹. La suppression des effets animalisants de l'acide thiomalique en présence de glutathion a été signalée récemment et interprétée comme résultant d'une compétition entre ces deux substances³⁰. Nous signalerons toutefois que l'acide ophtalmique récemment isolé et synthétisé par WALEY³¹ et dont la formule est analogue à celle du glutathion ne s'est pas montré animalisant chez *Paracentrotus lividus* à la concentration M/100³².

L'acide o-iodosobenzoïque, un agent oxydant les groupes sulphydryles, influence fortement le développement en direction animale^{33, 34}. Par contre d'autres agents oxydants ces groupes, tels que le périodate, l'iode et le ferricyanure sont dépourvus d'effets animalisants. Il en est de même avec une substance formant des mercaptides avec les groupes sulphydryles, l'acide p-chloromercuribenzoïque¹¹.

Nous avons exposé récemment deux nouvelles méthodes d'animalisation⁵. Elles sont basées sur les propriétés des ions zinc et de dérivés polycycliques acides. Ces méthodes sont d'une grande efficacité. L'animalisation des œufs entiers est en effet très régulièrement obtenue et s'exprime de façon homogène pour l'ensemble des embryons traités.

Déjà en 1936 LINDAHL⁷ avait signalé qu'un traitement très court des œufs fécondés par le chlorure mercurique lèse le matériel végétatif et provoque une légère extension de la touffe ciliée apicale. La suppression de l'entoderme avait été observée avec différents sels métalliques³⁵. Nous avons mis en évidence les effets animalisants des ions zinc^{5, 36} en traitant, après la fécondation, les œufs de l'oursin *Paracentrotus lividus*, par le chlorure de zinc. Pour une température donnée, le degré d'animalisation dépend de la concentration en ions zinc dans le milieu et de la durée du traitement. Avec une concentration de l'ordre de $5 \cdot 10^{-4} M$, on obtient des blastulas hyperciliées fortement animalisées, la touffe ciliée apicale recouvrant les trois quarts de la surface. Des formes larvaires à symétrie radiale se développent avec une concentration $1 \cdot 10^{-5} M$. Des formes larvaires de transition sont obtenues aux concentrations intermédiaires. Outre le chlorure, le sulfate, le nitrate et l'acétate de zinc sont efficaces. L'addition préalable d'un agent complexant les ions métalliques tel que l'acide éthylénediaminetétracétique, supprime complètement les effets des ions zinc. La sensibilité aux ions zinc au cours du développement embryonnaire évolue parallèlement à la sensibilité aux ions lithium³⁷. Les ions lithium, en con-

centration suffisante, sont capables de diminuer ou même de supprimer complètement les effets des ions zinc, rendant possible, dans cette seconde éventualité un développement sensiblement normal du pluteus³⁷. Le zinc peut être mis en évidence grâce à la coloration rouge qu'il développe en présence de dithizone. Dans les jeunes stades, le zinc se fixe essentiellement dans le mésenchyme primaire et dans l'entoderme. Nous avons également étudié la fixation du zinc dans les embryons préalablement végétativisés par le chlorure de lithium. La répartition du zinc s'effectue dans l'ordre décroissant suivant: mésenchyme primaire > intestin antérieur > intestin moyen³⁸. La fixation du zinc sur les régions végétatives est d'autant plus marquée que le caractère végétatif est plus accentué.

D'autres métaux ont été étudiés³⁸, notamment ceux présentant des propriétés voisines de celles du zinc. Le cadmium exerce des effets animalisants moins prononcés que ceux du zinc. La diminution d'activité conduit à l'augmentation des concentrations d'où résulte un renforcement notable de la toxicité se traduisant par une diminution de la viabilité des embryons. Le chlorure de nickel ($NiCl_2$) est moins毒ique, la concentration de 1/1000 est bien tolérée et permet le développement de blastulas couvertes de cils courts. La touffe ciliée apicale n'est pas formée, ni l'archentéron. Dans les solutions plus diluées (1/5000 par exemple), se développent des formes larvaires à symétrie radiale. Le chlorure de cobalt ($CoCl_2$) perturbe la gastrulation et inhibe le développement, mais aucun effet net n'est observé sur la détermination embryonnaire. Le chlorure de manganèse ($MnCl_2$) et le sulfate ferreux ($FeSO_4$) inhibent plus ou moins le développement, sans modifier la détermination embryonnaire. Chez *Dendraster excentricus*, un oursin de la famille des Scutellidés, les sels de zinc, de nickel et de cobalt provoquent le développement de formes larvaires à symétrie radiale. Les effets du zinc sont supprimés en présence de glutathion³⁹.

Nous étudierons maintenant les dérivés organiques polycycliques exerçant des effets animalisants. Nous avons obtenu l'animalisation avec des colorants sulfoniques⁵ appartenant à la série azoïque (bleu Trypan, rouge Trypan, rouge Congo) et à la série du triphénylméthane (bleu à l'eau, bleu d'aniline). Selon la concentration, ces colorants provoquent l'animalisation ou le développement de formes larvaires à symétrie radiale. Le bleu Trypan est plus actif que le rouge Trypan et le rouge Congo. Le bleu à l'eau et le bleu de méthyle sont également actifs, mais le second de ces colorants manifeste une toxicité plus élevée. Ces colorants inhibent ou ralentissent fortement l'éclosion. Ces résultats ont pu également être obtenus avec un grand nombre de substances colorantes ou non, appartenant

³⁰ S. BACKSTRÖM, Exp. Cell Res. 14, 426 (1958).

³¹ S. G. WALEY, Biochem. J. 68, 189 (1958).

³² R. LALLIER (observations non publiées). J'exprime mes remerciements au Dr. S. G. WALEY pour un don d'acide ophtalmique.

³³ J. RUNNSTRÖM et G. KRISZAT, Exp. Cell Res. 3, 497 (1952).

³⁴ S. BÄCKSTRÖM, Arkiv. Zool. 4, 485 (1953).

³⁵ A. J. WATERMAN, Biol. Bull. 73, 401 (1937).

³⁶ R. LALLIER, Arch. Biol. 66, 75 (1955).

³⁷ R. LALLIER, C. R. Acad. Sci. 246, 3674 (1958).

³⁸ R. LALLIER, J. Embryol. exp. Morphol. 4, 265 (1956).

³⁹ O. RULON, Anat. Rec. 177, 522, 615 (1953); Biol. Bull. 109, 316 (1955); - 113, 480 (1957).

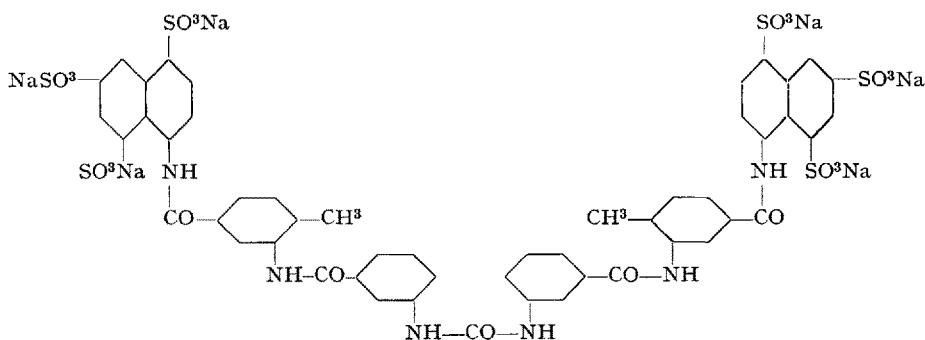
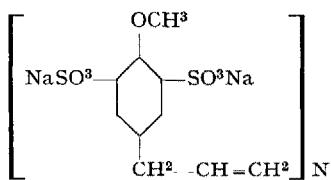


Fig. 3. Germanine.

à des séries chimiques distinctes. Outre celles que nous venons de signaler, nous avons également obtenu l'animalisation avec d'autres substances colorantes⁴⁰ telles que le bleu Evans, le bleu Niagara 6B et le jaune de métanile du groupe des colorants azoïques. Dans ce même groupe l'amarante, le bleu Niagara 4B, le chromotrope 2R, la crocéine brillante, le noir chlorazol E, l'orange G et le rouge Bordeaux provoquent le développement de formes larvaires à symétrie radiale.

Fig. 4. Polyanéthol sulfonate de sodium ($N \sim 40$).

Parmi les colorants dérivés du phénylméthane nous signalerons le bleu patent, le vert lumière, le vert acide FCF, le violet de chrome CG et la fuchsine acide qui agissent surtout sur la symétrie larvaire. Il en est de même avec le bleu d'alizarine GR, dérivé de l'anthraquinone et l'induline, dérivé à structure quinone-imine. Les dérivés du xanthène donnent deux colorants animalisants⁴¹, le rose Bengale et l'uranine, tandis que la violamine R agit surtout sur la symétrie larvaire. Un colorant nitré tel que l'acide picrique est par contre dépourvu d'effets animalisants. Parmi les substances non colorées, les dérivés sulfoniques du naphtalène, du naphtol et de la naphtylamine^{40, 42} constituent des agents animalisants actifs à concentrations élevées (1/100). En solution plus diluée ils provoquent le développement de formes larvaires à symétrie radiale. D'autres substances enfin, une urée synthétique substituée, la Germanine⁴³ (fig. 3), un polyphénol sulfoné, le polyanétholsulfonate de sodium⁴⁴ (fig. 4) et plusieurs dérivés polysulfoniques de synthèse⁴³ se montrent capables, selon la concentration d'animaliser les embryons ou de changer leur type de

symétrie. Ce dernier effet s'observe également avec un dérivé sulfoné de la lignine, l'acide lignosulfonique⁴⁰.

Toutes ces substances possèdent des fonctions acides, sous la forme de groupes sulfoniques ou carboxyles. L'étude des relations entre l'activité et la structure de ces substances nous a permis de tirer les conclusions suivantes⁴⁰: la présence de groupes acides apparaît essentielle pour que se manifestent les effets animalisants ou le changement de type de symétrie. Ces groupes acides peuvent être de nature sulfonique ou carboxylique. L'activité est compatible avec la présence d'un ou plusieurs de ces groupes acides par molécule, mais leur accumulation sur une molécule de petite taille tend à diminuer l'activité. La position de ces groupes dans la molécule joue un rôle important. L'exemple suivant illustre ce phénomène: les bleus Niagara 6B et 4B (fig. 5 et 6) ne diffèrent que par la position de leurs groupes sulfoniques en 2-4 dans le bleu Niagara 6B et en 3-6 dans son homologue 4B, or le dérivé en 2-4 est plus actif que le dérivé en 3-6. Il est intéressant de signaler que l'affinité du bleu Niagara 6B pour les protéines est supérieure à celle de son homologue 4B. Nous reviendrons sur ce point au cours de la discussion. Les groupes autres que les groupes acides interviennent également dans l'activité, soit directement par les liaisons qu'ils peuvent former avec les constituants cellulaires, soit indirectement en déterminant la force de la fonction acide. Nous donnerons comme exemple de ce dernier cas, celui du rose Bengale et de l'uranine. Le rose Bengale et l'uranine ne diffèrent que par la présence d'halogènes sur la molécule de rose Bengale (fig. 7 et 8). Ces groupes électronégatifs augmentent la force de la fonction acide et l'on observe précisément que l'activité animalisante du rose Bengale est nettement plus forte que celle de l'uranine. Du nombre et de la nature des noyaux de la substance dépendent des propriétés importantes pour l'activité, telles que la solubilité et l'aptitude à pénétrer dans les cellules et à s'y fixer. Tous ces dérivés exercent en outre des effets inhibiteurs plus ou moins prononcés sur la fécondation et sur l'éclosion. Un certain parallélisme a été signalé entre ces phénomènes^{42, 45}. L'emploi

⁴⁰ R. LALLIER, Arch. Biol. (sous presse).⁴¹ R. LALLIER, Exper. 13, 362 (1957).⁴² R. LALLIER, C. R. Acad. Sci. 244, 3176 (1957).⁴³ R. LALLIER, Exper. 12, 217 (1956); Pubbl. Staz. zool. Napoli 30, 185 (1957).⁴⁴ R. LALLIER, C. R. Soc. Biol. 151, 638 (1957).⁴⁵ J. RUNNSTRÖM, Zool. Anz. 156, 91 (1956).

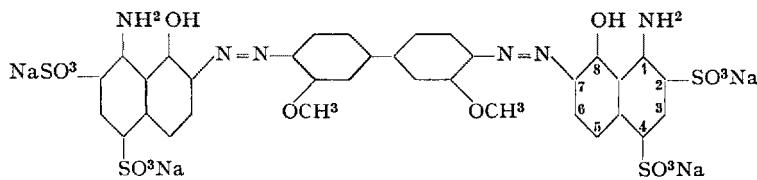


Fig. 5. Bleu Niagara 6B

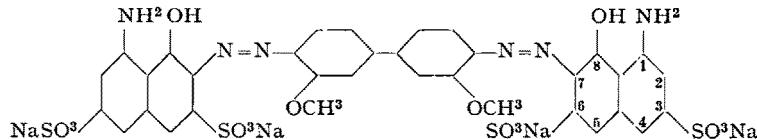


Fig. 6. Bleu Niagara 4B

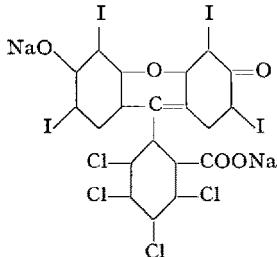


Fig. 7. Rose Bengale.

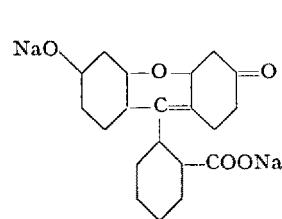


Fig. 8. Uranine.

de substances animalisantes colorées est avantageux car il permet d'observer directement leur répartition dans l'embryon. Nous avons étudié la répartition du bleu Evans et du bleu de ciel⁴³. Ces colorants se fixent dans le mésenchyme primaire et à un moindre degré dans les régions entodermiques de la jeune gastrula. Dans l'embryon préalablement végétativisé par le lithium la fixation du colorant s'effectue dans l'ordre décroissant suivant: mésenchyme primaire > intestin antérieur > intestin moyen. La fixation est d'autant plus forte que les régions ont un caractère végétatif plus marqué. Nous avons déjà observé ce phénomène avec les ions zinc.

Les effets animalisants du bleu Evans sont supprimés en présence de doses convenables de riboflavine et de thiamine. Ces substances forment des combinaisons avec le colorant⁴⁶. Cet effet protecteur n'est pas observé avec les ions zinc. Les ions lithium exercent un effet antagoniste sur ceux du bleu de ciel⁴³. Selon la concentration, les effets végétativisants du lithium ou ceux animalisants du colorant prédominent, mais ils ne se compensent pas au point de permettre le développement normal du pluteus. Le lithium ne supprime pas l'inhibition de l'éclosion par le colorant, il la renforce.

La notion de gradient introduite en embryologie par BOVERI se trouve à la base de plusieurs interprétations de la morphogenèse. Selon CHILD⁴⁷ toute la morphogenèse est contrôlée par un gradient physiologique unique à caractère quantitatif. Cette conception est

fondée sur l'étude de la susceptibilité différentielle de l'embryon à des agents cytolytiques et de la réduction en anaérobiose de colorants tels que le bleu de méthylène et le vert Janus.

La conception de RUNNSTRÖM⁴⁸ repose sur l'existence de deux gradients antagonistes qualitativement différents: un gradient animal et un gradient végétatif, dont l'interaction mutuelle règle le développement normal. Les expériences de transplantation de HÖRSTADIUS¹ ont montré l'existence de deux gradients et leurs interactions. Par la méthode de réduction du vert Janus en anaérobiose, HÖRSTADIUS⁴⁹ a mis en évidence un gradient animal de réduction dans les moitiés animales isolées et un gradient végétatif dans les moitiés végétatives. Le gradient animal dans les moitiés animales est restreint par l'implantation de matériel végétatif sous la forme de micromères. Dans les œufs entiers animalisés par la trypsine il ne subsiste qu'un seul gradient animal. La réduction du colorant commence plus tôt dans les embryons animalisés que dans les embryons normaux ou végétativisés. Nous avons également observé ce phénomène avec les embryons animalisés par le zinc⁵⁰. Ces expériences montrent l'existence de deux gradients de réduction de signe opposé, mais elles ne donnent aucune indication sur la nature des processus mis en jeu. LINDAHL⁷ a porté le problème des gradients sur une base physiologique en cherchant à élucider leur nature biochimique. Son analyse de l'action du lithium sur la respiration l'a con-

⁴⁶ R. LALLIER (observations non publiées).

⁴⁸ J. RUNNSTRÖM, Acta Zool. 9, 365 (1938); Roux' Arch. 117, 123 (1929).

⁴⁹ S. HÖRSTADIUS, J. exp. Zool. 120, 421 (1952); — J. exp. Zool. 129, 249 (1955).

⁵⁰ R. LALLIER, Arch. Biol. 67, 475 (1956).

⁴⁷ C. M. CHILD, *Patterns and Problems of Development* (University Chicago Press, Chicago 1941).

duit à envisager la prédominance d'un métabolisme des hydrates de carbone dans les régions animales, cependant que, de l'étude des œufs animalisés par l'eau de mer sans sulfate, il déduisait une prédominance d'un métabolisme protéique dans les régions végétatives. La mesure, par la technique du ludion, de la consommation d'oxygène des moitiés animales et végétatives isolées n'a toutefois pas révélé de différences⁵¹. Sans permettre de conclusion définitive, en raison de leur caractère limité, ces recherches ne permettent toutefois pas de conclure en faveur de l'existence d'un gradient respiratoire animal-végétatif. L'étude de la répartition de la dipeptidase a montré d'autre part que les blastomères animaux et végétatifs isolés au stade VIII présentent sensiblement la même teneur en enzyme⁵². LINDAHL⁷ a montré que l'oxygène est indispensable au processus de l'animalisation. L'abaissement de la teneur en oxygène ou l'addition de cyanure empêche en effet l'animalisation par le sulfocyanure ou l'iode. Le sulfocyanure inhibe la respiration. Cette inhibition intervient d'ailleurs avant que des modifications morphologiques visibles puissent être constatées⁵³. Un autre agent animalisant l'acide o-iodosobenzoïque inhibe également la respiration, mais a un effet moins prononcé pendant les premiers stades où l'effet morphogénétique est le plus marqué⁵⁴. Le lithium, lui-même antagoniste de l'animalisation, diminue la respiration des embryons animalisés. Nous avons signalé précédemment que divers agents interférant avec le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire, sont également aptes à provoquer ou à augmenter l'animalisation. L'animalisation apparaît donc liée à des processus d'oxydation, dont la nature reste d'ailleurs à préciser. L'analyse de ces processus implique la connaissance du métabolisme normal. Celui-ci a fait l'objet de travaux récents⁵⁵ portant sur le métabolisme des glucides et des acides aminés. Dans l'œuf de différents oursins le catabolisme des glucides se ferait selon le schéma de Embden-Meyerhoff et le cycle des acides tricarboxyliques. Ces études ouvrent la voie à l'analyse systématique du métabolisme des embryons animalisés et végétativisés.

Les effets des agents animalisants et végétativisants s'accompagnent de modifications structurales au niveau du cytoplasme. Plusieurs auteurs⁵⁶ ont émis l'idée que les substances végétativisantes doivent leurs effets à leur faculté de précipiter les colloïdes. Réciproquement

⁵¹ H. HOLTER et P. E. LINDAHL, C. R. Lab. Carlsberg [Ser. Chim.] 23, 249 (1940).

⁵² H. HOLTER et P. E. LINDAHL, C. R. Lab. Carlsberg [Ser. Chim.] 23, 257 (1940).

⁵³ N. H. HOROWITZ, J. cell. comp. Physiol. 15, 299 (1940).

⁵⁴ S. BÄCKSTRÖM, Arkiv. Zool. 7, 573 (1955).

⁵⁵ K. W. CLELAND et LORD ROTHSCHILD, J. exp. Biol. 29, 285, 416 (1952). — M. YČAS, J. exp. Biol. 31, 208 (1954). — J. L. KAVANAU, Exp. Cell Res. 7, 530 (1954). — A. K. KELTCH, M. E. KRAHL et G. H. A. CLOWES, J. gen. Physiol. 40, 27 (1956). — M. E. KRAHL, Biochim. biophys. Acta 20, 27 (1956).

⁵⁶ S. RANZI et M. FALKENHEIM, Pubbl. Staz. zool. Napoli 16, 436 (1937). — C. HERBST, Roux'Arch. 142, 319 (1943). — E. TAMINI, R. C. 76, 363 (1943).

les substances exerçant un effet dispersant sur les colloïdes, telles que par exemple, le sulfocyanure et l'iode, seraient animalisantes.

Les effets des agents animalisants ont été étudiés sur l'œuf entier et sur les protéines extraites de l'œuf d'oursin ou de différents autres organismes.

Les effets du sulfocyanure sur la viscosité de l'œuf entier ont été mis en évidence par l'examen de la stratification des inclusions cytoplasmiques dans les œufs centrifugés. Le sulfocyanure diminue la viscosité des œufs vierges⁹, ⁵⁷. Il exerce un effet cytolytique sur les œufs fécondés. L'ion potassium renforce les effets du sulfocyanure⁹.

RANZI et ses collaborateurs⁵⁸ ont étudié l'action de différents agents animalisants sur la viscosité des protéines. Les agents animalisants étudiés diminuent *in vitro* la viscosité des protéines fibreuses et augmentent celle des protéines globulaires. L'étude des protéines extraites des embryons d'oursins animalisés montre que ces effets s'exercent également *in vivo* et qu'ils sont proportionnels aux effets morphogénétiques. Les protéines fibrillaires extraites des embryons traités par le sulfocyanure sont moins résistantes aux effets du chlorure de lithium ainsi qu'à la digestion enzymatique par la trypsine et la papaïne. La viscosité et la biréfringence de flux de l'actomyosine du lapin sont diminuées par le sulfocyanure. Ces phénomènes s'accompagnent de la perte de la structure fibrillaire mise en évidence au microscope électronique. Avec l'actomyosine, on note une augmentation des groupes hydroxyles et des groupes donnant la diazoréaction. Les propriétés immunologiques sont également changées. L'interprétation de ces résultats a conduit RANZI à attribuer un rôle essentiel aux différences de stabilité des protéines au cours de la détermination embryonnaire. Il se produirait au cours de l'animalisation une destruction des structures protéiques. Ce phénomène serait inhibé par les agents végétativisants qui stabilisent les structures protéiques.

Les agents animalisants que nous étudierons maintenant (ions métalliques et dérivés polycycliques) présentent tous une affinité marquée pour les protéines. Les groupes sulfhydriles et imidazoles fixent les ions zinc. Les dérivés polycycliques se fixent aux groupes basiques par leurs groupes sulfoniques ou carboxyliques. Des liaisons de type van der Waals entre groupes non polaires entrent également en jeu dans l'association de ces dérivés avec les protéines. Ces liaisons contribuent d'ailleurs, selon leur nombre, à accroître la stabilité des complexes formés.

Il y a plusieurs indications qui permettent de penser que les groupes sulfhydriles n'interviennent pas directement dans le déterminisme de l'animalisation : l'acti-

⁵⁷ S. ABRUZZESE SCARLATA, Ric. sci. Mem. 17, 473 (1947).

⁵⁸ R. AROSIO, P. CITTERIO, S. RANZI et L. TOSI, Rendiconti 82, 145 (1949). — S. RANZI et P. CITTERIO, Pubbl. Staz. zool. Napoli 25, 201 (1954). — S. RANZI, Ann. Biol. 33, 523 (1957).

vité animalisante des ions métalliques n'est pas parallèle à leur affinité pour ces groupes³⁸. On trouve parmi les agents animalisants des substances réductrices (acide thiomalique)⁹ ou oxydantes (acide o-iodosobenzoïque)³³. Le blocage systématique des groupes sulfhydryles par différents oxydants ne provoque pas l'animalisation¹¹. Enfin les dérivés polycycliques fortement animalisants ne présentent pas d'affinité particulière pour les groupes sulfhydryles⁴³. Ces observations ne favorisent donc pas l'idée d'une intervention directe des groupes sulfhydryles au cours de l'animalisation.

Examinons maintenant les groupes présentant une affinité pour ces deux types de substances animalisantes. Les groupes imidazoles des protéines fixent les ions zinc et les dérivés polycycliques acides. L'additivité des effets de ces agents peut s'expliquer en considérant que l'animalisation dépend du blocage d'un nombre suffisant de ces groupes imidazoles. Nous avons montré que les ions zinc, comme les colorants acides animalisants, se fixent par ordre de préférence dans les régions les plus végétatives de l'embryon. En raison de l'affinité de ces substances pour les protéines, on peut donc conclure que les régions animales et végétatives sont formées de protéines de natures différentes. Nous rappelerons brièvement que selon les conceptions actuelles, les propriétés biologiques des protéines et notamment leur affinité pour différentes substances, dépendent de leur configuration, c'est-à-dire du mode d'arrangement de leurs chaînes peptidiques. C'est de la configuration de la molécule protéique que dépend la répartition des groupes (exogroupes) situés à la surface de la molécule. La nature basique de ces exogroupes déterminerait l'affinité des protéines pour les colorants acides. Les différences d'affinité constatées entre les protéines des régions animales et végétatives s'expliqueraient par leurs différences de structure et plus particulièrement de configuration. Il est ainsi possible de concevoir une interprétation générale des effets des agents animalisants et végétativisants fondée sur leur aptitude à changer la structure des protéines. Cette action peut s'exercer directement ou indirectement. Dans le premier cas, elle porte sur les molécules protéiques déjà formées. Les recherches de RANZI et de ses collaborateurs montrant que la plupart des agents actifs modifient profondément les propriétés des protéines fibrillaires et globulaires nous donnent un exemple de cette action directe sur la structure des protéines. Dans le second cas, l'action s'exerce indirectement en intervenant aux cours de la synthèse des protéines. Des travaux récents⁵⁹, il ressort que c'est au cours de leur synthèse que les molécules protéiques acquièrent leur configuration caractéristique. L'introduction dans le milieu cellulaire de différentes substances (ions, macromolécules, agents réducteurs) en changeant les caractéristiques de ce milieu interféreraient avec les mécanismes responsables de la configuration

des protéines. Des phénomènes de compétition peuvent également intervenir au cours de la synthèse des chaînes peptidiques et influer sur l'incorporation des acides aminés. Ces hypothèses pourraient d'ailleurs être étudiées et précisées sur d'autres systèmes synthétisant les protéines et moins complexes que les embryons.

Nous devons également considérer que des agents morphogènes très actifs, tels que les ions zinc et les dérivés polycycliques, sont d'une manière générale, et aux concentrations utilisées, étrangers au métabolisme normal. On peut donc concevoir que ces substances exercent leurs effets grâce à leur affinité pour des agents morphogènes normalement présents dans l'embryon et dont le rôle est de contrôler la différenciation des structures protéiques. La fixation d'ions zinc ou de dérivés polycycliques acides interférerait avec cette activité de contrôle.

En conclusion, l'animalisation peut être considérée comme représentant l'expression la plus complète de l'activité morphogénétique lorsque celle-ci est libérée de l'influence des facteurs d'inhibition ou de modulation intervenant au cours du développement normal.

Summary

This paper deals with the problem of embryonic differentiation in Echinoderms. In sea urchin eggs, the balance between animal (ectoderm) and vegetative (mesentoderm) trends may be shifted by operative treatments or chemical agents. Animalization is the enlargement of the animal germ layers at the expense of vegetative germ layers. The reverse effect is vegetalization.

In this paper, the problem of animalization is examined. The different chemical treatments for animalization and the modality of their action are reviewed. Animalization may be induced by treatment with thiocyanate or iodide, proteolytic enzymes, o-iodosobenzoic acid and thiomalic acid and also various antimetabolites.

Two new methods inducing the animalization are studied. They are based on the action of heavy metal salts and polycyclic chemicals. The animalization is very strong and regularly obtained in whole eggs treated with zinc ions. At lower concentration, the zinc ions induce the development of embryos with radial symmetry. The activity of zinc is compared with the activity of other heavy metals. Some polycyclic compounds with sulfonic or carboxylic groups are very active. These agents exert some animalizing or radializing effects depending upon the concentration. The activity of these compounds is studied in relation to their structure. The distribution of zinc and organic compounds in the embryos is studied. Both present an affinity for the more vegetative parts. The action of lithium chloride on animalizing effects of these agents is examined and the summation of the effects of zinc ions and polysulfonic compounds (bleu Evans) is demonstrated. The affinity of these agents for proteins and the nature of possible interactions are discussed.

The effects of animalizing agents on respiration and structure of whole eggs are reviewed and also their influence on the viscosity of proteins extracted from sea urchin embryos and various organisms.

It is concluded that the animalizing agents interfere with the synthetic process of specific proteins during the embryonic development by inducing a change in the configuration of protein molecules.

⁵⁹ F. HAUROWITZ, J. cell. comp. Physiol. 47, suppl. 1, 1 (1956).