

Effets de la 2-mercaptopropionyl-glycine sur la différenciation de l'œuf d'oursin

La différenciation de l'œuf d'oursin peut être changée expérimentalement par l'action de certains agents chimiques. Ceux-ci, ajoutés au milieu de culture, modifient l'équilibre entre les tendances à la différenciation de l'ectoderme d'une part et de l'entomésoderme d'autre part. Certains de ces agents sont capables de réagir avec les groupes -SH soit qu'ils constituent eux-mêmes des substances sulfhydrilées, comme l'acide thiomalique¹ qu'ils les oxydent comme l'acide *o*-iodosobenzoïque² ou bien, tel le Salyrgan, forment avec eux des mercaptides³. Ces agents présentent en commun la propriété de favoriser la différenciation des territoires ectodermiques, phénomène connu sous le nom d'animalisation.

Nous examinerons ici les effets d'un agent sulfhydrilé nouveau la 2-mercaptopropionyl-glycine ou Thiola: $\text{CH}_3\text{-CHSH-CONH-CH}_2\text{-COOH}$. Le potentiel d'oxydoréduction de ce produit est intermédiaire entre ceux du glutathion et de la cystéine.

Les œufs fécondés de l'œuf d'oursin *Paracentrotus lividus* sont cultivés en présence de Thiola, soit avant la formation du premier sillon de segmentation, c'est à dire 30 min après la fécondation, soit au stade jeune blastula. Chaque culture contient un nombre d'œufs de l'ordre de 2000/ml provenant tous d'une même femelle dans chaque série d'expériences. Thiola est dissous directement dans l'eau de mer; le pH est ajusté à 8,2 correspondant au pH de l'eau de mer normale.

Avec Thiola 0,1 M, la segmentation, d'abord retardée par rapport aux témoins, est arrêtée aux stades 32, 64 blastomères. Avec 0,05 M la segmentation, encore ralentie, se poursuit jusqu'au stade blastula. Ces larves se lysent avant d'éclore. Le report dans l'eau de mer normale après 21 h de traitement permet d'obtenir l'éclosion de larves ciliées, sphériques ou plus ou moins déformées, dépourvues d'archentéron. Avec les concentrations 0,03 M et 0,02 M, en culture continue, les larves sphériques présentent un épaississement ectodermique apical très développé, recouvert de longs cils et couvrant les 3/4 de la surface de la larve. L'éclosion n'est ébauchée qu'à partir de la concentration 0,02 M. Le report dans l'eau de mer après 23 h de traitement permet d'obtenir de petits pluteus. Un traitement prolongé jusqu'à 44 h donne des larves animalisées hyperciliées de type 1/2 et 1/4. Nous rappellerons ici que, dans la larve normale, la touffe ciliée apicale recouvre le 1/8 de la surface de la larve au pôle animal. Avec 0,03 M, les larves présentent encore une légère augmentation de la touffe ciliée apicale; l'archentéron est formé mais il reste de petite taille. De 0,005 M à 0,001 M on obtient des pluteus; avec 0,001 M, ils sont de même taille que les pluteus témoins.

Les larves traitées à partir du stade blastula (0,05 M et 0,02 M) donnent également des embryons hyperciliés. La zone des longs cils s'étend des 3/4 au 1/4 de la surface de la larve. Une petite vésicule archentérique est formée dans les solutions 0,03 M et 0,02 M. Avec 0,03 M l'animalisation s'observe encore; elle est toutefois moins importante que dans les larves précédentes; l'archentéron, de petite taille, se différencie en 2 vésicules. Des pluteus se développent à partir de la concentration 0,005 M.

On sait que l'oxydation des substances sulfhydrilées en présence d'ions cuivre produit de l'eau oxygénée⁴. Nous avons recherché l'influence de ces ions sur l'action animalisante de Thiola et constaté que celle-ci n'est pas modifiée en présence de CuCl_2 (1×10^{-5} M). La présence d'un agent complexant les ions métalliques, le Komplexon III (2 mg/ml) ne change pas non plus l'activité animalisante de Thiola. La présence d'ions métalliques qui favorisent

la formation de peroxyde d'hydrogène n'influe donc pas sur l'activité animalisante de Thiola.

Discussion. Si l'on compare les effets de l'acide thiomalique et de Thiola avec ceux exercés par d'autres agents sulfhydrilés déjà étudiés, comme par exemple la cystéine⁵, le mercaptoéthanol⁶, le thioglycérol et le thiosorbitol⁷, on constate que seuls l'acide thiomalique et Thiola sont animalisants. Les autres agents sulfhydrilés, notamment les 3 derniers cités, inhibent la mitose et désorganisent la structure de l'appareil mitotique. Ces différents effets peuvent être dus à des différences de perméabilité, l'effet antimitotique ne s'observant que lorsque l'œuf présente une perméabilité suffisante pour permettre à l'agent d'atteindre l'appareil mitotique. On peut donc concevoir, ainsi que nous l'avons suggéré pour l'acide thiomalique⁸, que Thiola exerce ses effets en agissant essentiellement sur les structures superficielles de l'œuf. La présence d'un groupe -SH apparaît nécessaire à l'activité de ces substances. L'acide thiomalique oxydé perd ses effets animalisants⁹. D'autres agents capables de réagir avec les groupes -SH (acide *o*-iodosobenzoïque et Salyrgan) sont également animalisants. Cependant, là encore, toutes les substances capables de réagir avec les groupes -SH par oxydation ou formation de mercaptides ne sont pas nécessairement animalisantes. C'est le cas de nombreux oxydants, de dérivés disulfures et de l'acide *p*-chloromercuribenzoïque notamment⁸.

Les résultats obtenus indiquent la participation des groupes -SH dans les processus de l'animalisation expérimentalement provoquée par les agents sulfhydrilés et les réactifs des groupes -SH. Des particularités structurales doivent être responsables de l'activité ou de l'inactivité de ces agents sur la détermination embryonnaire. Nous suggérons le cortex de l'œuf comme site d'action de ces agents. La présence de groupes -SH a été démontrée dans le cortex¹⁰. Les expériences de centrifugation¹¹ suggèrent que le cortex est le siège de la polarité selon l'axe animal-végétatif. En outre les influences réciproques entre blastomères peuvent être contrôlées par le cortex. Ces influences mises en évidence par les expériences de translocation¹² jouent un rôle essentiel dans la régulation de la morphogénèse larvaire. Au cours de la période de segmentation, pendant laquelle l'œuf présente une sensibilité maximale à l'effet des agents animalisants et végétalisants, de nouvelles structures corticales sont élaborées. On peut concevoir que la synthèse de ces structures dépend d'une part de la fraction du cortex primitif de l'œuf qui est attribuée à chaque nouveau blastomère et, d'autre part, des conditions dans lesquelles elle s'effectue. Nous suggérons que les agents sulfhydrilés animalisants en agissant sur ces synthèses modifient les structures corticales avec comme conséquence un changement de leur perméabilité. Ces changements influent à leur tour sur la

¹ R. LALLIER, *Experientia* 8, 271 (1952).

² J. RUNNSTRÖM et G. KRISZAT, *Expl Cell Res.* 3, 497 (1952).

³ R. LALLIER, C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris 250, 3380 (1960).

⁴ A. SCHÖBERL, *Z. physiol. Chem.* 207, 167 (1921).

⁵ R. LALLIER, C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris 248, 2397 (1959).

⁶ D. MAZIA et A. M. ZIMMERMAN, *Expl Cell Res.* 15, 138 (1958).

⁷ R. LALLIER, *J. Cell Biol.* 15, 382 (1962).

⁸ R. LALLIER, *Devl Biol.* 5, 218 (1962).

⁹ R. LALLIER, C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris 246, 2810 (1958).

¹⁰ H. SAKAI, *J. biophys. biochem. Cytol.* 8, 603 (1960).

¹¹ S. HÖRSTADIUS, *Pubbl. Staz. zool. Napoli* 24, 45 (1953).

¹² S. HÖRSTADIUS, *Pubbl. Staz. zool. Napoli* 14, 251 (1935).

circulation des substances morphogènes entre les blastomères. Cette circulation fondant l'unité organique de la larve en harmonisant les activités des différents blastomères, toute perturbation à ce niveau peut entraîner des modifications dans la proportion relative des structures ectodermiques et entomésodermiques.

Nous rappellerons, pour terminer, que l'acide thiomalique modifie également la différenciation de l'œuf d'amphibien; il suscite en effet la formation de structures chordomésoblastiques à partir d'ectoblaste présomptif^{13,14}. Il serait intéressant de rechercher si Thiola est également capable de provoquer de telles modifications chez l'amphibien. Les résultats déjà obtenus avec l'acide thiomalique suggèrent l'existence d'une base commune aux processus régulateurs de la différenciation chez les amphibiens et les échinodermes.

Summary. 2-Mercaptopropionyl-glycine (Thiola) exerted a strong animalizing action on the development of the sea urchin, *Paracentrotus lividus*. The action of Thiola on the synthesis of superficial and cortical cellular structures newly synthesized during the segmentation is suggested. These changes may alter the circulation of morphogenetic substances between blastomeres.

R. LALLIER

Station Zoologique, 06 Villefranche-sur-Mer (France),
26 février 1968.

¹³ L. RAPKINE et J. BRACHET, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 427 (1951).

¹⁴ R. LALLIER, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 439 (1951).

Influence of Adrenergic Blocking Agents Upon Morphine and Catecholamine Analgesic Effect

The mechanism of the analgesic action of morphine is still unknown. Several theories have been proposed, but they are not satisfactory as yet.

Some authors¹⁻³ postulate that the analgesic effect of morphine is mediated by parasympathic mechanisms. MERCIER et al.⁴ and others⁵ believe that serotonin is an important neurohumoral agent concerning these effects. Since MARTHA VOGT reported in 1954⁶ that morphine reduces the amount of catecholamines in the brain, many authors have supposed that these agents exert an enhancing influence on the analgesic effect of morphine. Also, some authors reported that epinephrine and related substances possess a significant analgesic efficacy of their own⁷⁻¹⁰. On the other hand, the monoamine oxidase inhibitor iproniazid enhances¹¹ and reserpine diminishes¹²⁻¹⁴ the analgesic effect of morphine. It is well known that these drugs raise and lower, respectively, the catecholamine content of the brain. Unfortunately, we know almost nothing about the nature of the adrenergic receptors involved in the central actions of catecholamines¹⁵.

We therefore proposed to study: (1) the proper analgesic effect of catecholamines; (2) their effect upon the analgesic action of morphine, and (3) the influence of adrenergic blocking agents of α and β type upon the catecholamine and morphine analgesic effects, using the α -blocking agent dihydroergotamine and the β -blocking agent propranolol, both drugs having powerful actions upon the central nervous system of mammals^{16,17}.

Method. We used a method based on that of JANSSEN¹⁸, BEN-BASSAT et al.¹⁹ and GREEN et al.²⁰. We employed white female mice, weighing 17-30 g. The painful stimulus consisted of warm water ($50 \pm 1^\circ\text{C}$) applied to the tail of the animals. Untreated animals removed their tail from the warm water with a sharp movement (tail withdrawal reflex) within the first 3-4 sec of exposure. The same animals were then treated with drugs and the reaction time was measured again every 15 min until the effect disappeared. The drugs were dissolved in distilled water and administered i.p. The time of reaction to the painful stimulus was measured in sec and the standard deviation of the mean was determined. Each group consisted of 6 animals. The injection of distilled water alone did not modify the reaction time.

Results. (1) Effect of morphine and catecholamines. Morphine showed a significant analgesic effect at a dose

of 1 mg/kg, i.p. Also the catecholamines epinephrine, norepinephrine and isoproterenol produced significant analgesic effects in this test. The minimal doses with significant analgesic effect were: epinephrine 0.25 mg/kg, norepinephrine 0.5 mg/kg and isoproterenol 4 mg/kg.

Catecholamines enhanced the effect of small doses of morphine (1 mg/kg), epinephrine and norepinephrine increasing the duration and the maximum of morphine analgesic effect, but isoproterenol only increased the duration of the significant effect from 45-105 min without affecting its maximum. We have not demonstrated a potentiation for higher doses of morphine (2.5 mg/kg).

(2) Effect of α - and β -adrenergic blocking agents. Propranolol and dihydroergotamine were used at doses that

¹ T. GORDONOFF, Archs int. Pharmacodyn. Théor. 722, 208 (1959).

² P. N. SAXENA, Indian J. med. Res. 46, 653 (1958).

³ W. SCHAUHMANN, Arch. exp. Path. Pharmac. 237, 229 (1959).

⁴ M. F. MERCIER, P. ETZANSFERGER and M. J. MERCIER, Presse méd. 67, 312 (1959).

⁵ L. J. GARCIA and M. ROCHA E SILVA, J. Pharm. Pharmac. 15, 454 (1963).

⁶ M. VOGT, J. Physiol. 723, 451 (1954).

⁷ K. I. COLVILLE and E. CHAPLIN, Life Sci. 3, 315 (1964).

⁸ A. LEIMDORFER and W. R. T. METZNER, Am. J. Physiol. 157, 116 (1949).

⁹ S. RADOUCO-THOMAS, C. RADOUCO-THOMAS and E. LE BRETON, Arch. exp. Path. Pharmac. 232, 279 (1957).

¹⁰ A. B. ROTHBALLER, Pharmac. Rev. 11, 494 (1959).

¹¹ R. DEFALQUE, J. Anesth. Analg. cur. Res. 44, 190 (1965).

¹² R. ALONSO VERRI, F. G. GRAEFF and A. P. CORRADO, J. Pharm. Pharmac. 19, 264 (1967).

¹³ E. T. ECKHARDT, F. CHEPLOVITZ, M. LIPO and W. M. GOVIER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98, 186 (1958).

¹⁴ A. D. RUDZIK and J. H. MENNEAR, J. Pharm. Pharmac. 17, 126 (1965).

¹⁵ G. C. SALMOIRAGHI, Pharmac. Rev. 18, 717 (1966).

¹⁶ G. LESZKOVSKY and L. TARDOS, J. Pharm. Pharmac. 17, 518 (1965).

¹⁷ M. NICKERSON, Pharmac. Rev. 1, 27 (1949).

¹⁸ P. A. J. JANSSEN, C. J. E. NIEMEGERES and J. G. H. DONY, Arzneimittelforsch. 13, 502 (1963).

¹⁹ J. BEN-BASSAT, E. PERETZ and F. G. SULMAN, Archs int. Pharmacodyn. Théor. 722, 434 (1959).

²⁰ A. F. GREEN, P. A. YOUNG and E. I. GODFREY, Br. J. Pharmac. 6, 572 (1951).