

It seems plausible to suppose that both the above mechanisms operate. As regards to the possible role of phase-transition, the concentration dependence of t_1 can be considered. It has recently been shown by TRÄUBLE and EIBL¹⁴ that the ordered-fluid phase-transition temperature of phospholipids can be lowered to a large extent by increase of either the ionic strength or the pH. Applying TRÄUBLE and EIBL's theoretical arguments to the liquid crystal-gel transition of membrane lipids, the variation of t_1 with concentration can readily be explained.

The concentration-dependence of the demarcation temperatures t_1 and t_2 , as well as that of temperature-insensitive ranges Δt ($\Delta t = t_2 - t_1$)

Concentration	$10^{-3} M$	$10^{-4} M$	$10^{-5} M$
t_1 (°C)	4.5	9.5	9.5
t_2 (°C)	17.0	17.0	14.0
Δt (°C)	12.5	7.5	4.5

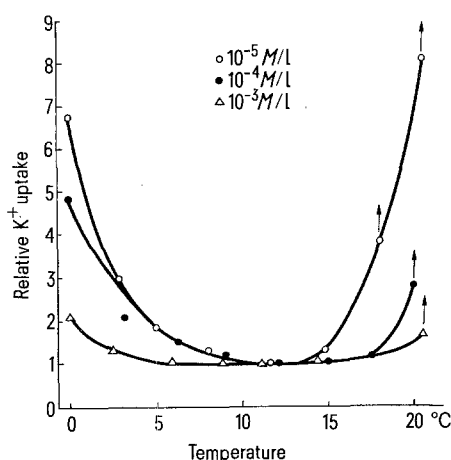


Fig. 3. Relative K^+ uptake by cucumber roots at different temperatures and different K -ion concentrations of the absorption solution. Uptake time 64 min. The arrows indicate that the data are not stationary values as shown in Figure 1.

As far as the PU above t_2 is concerned, we have no unequivocal and convincing interpretation. It is possible that a K^+ - Na^+ -activated ATPase system may be operating in the roots. The probability of such a system was apparently supported by the concentration-dependence of the demarcation temperature t_2 . Namely, if such an uptake system were involved in the PU above t_2 , the inhibitory effect of increasing K^+ concentration in the absence of Na -ions could explain the concentration-dependence of t_2 . However, no increase in the PU could be induced by adding different amounts of $NaCl$ to the absorption solution. Although there is no doubt that an active system is operating above t_2 , the basic character of this process is still completely obscure. In this connection we refer to the excellent publication by IPI, dealing with the biochemical and physiological aspects of PU by living organisms¹⁵. Similarly, no satisfactory explanation can be furnished for the nature and character of PU between t_1 and t_2 .

It seems that the mechanism of the AIPU of thermophilic plants is rather complicated and somewhat different from that of other plants. However, the understanding of these processes is of great theoretical and practical (agricultural) importance and worthy of further investigations. These are now in progress.

Zusammenfassung. Nachweis, dass in der thermophilen Gurke (*Cucumis sativus*) ein mehrphasiges K^+ -Aufnahmesystem existiert, welches sich von jenem kälteunempfindlicher Pflanzen unterscheidet. Untersucht wurden abgetrennte Gurkenwurzeln im Temperaturbereich von 0 und 21 °C.

F. ZSOLDOS and B. KARVALY¹⁶

Department of Plant Physiology, József Attila University, P.O. Box 428, H-6701 Szeged (Hungary); and Institute of Biophysics, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, P.O. Box 521, H-6701 Szeged (Hungary), 5 July 1974.

¹⁴ H. TRÄUBLE and H. EIBL, Proc. natn. Acad. Sci. 71, 214 (1974).

¹⁵ Potassium in Biochemistry and Physiology (Publ. International Potash Institute, Berne 1971).

¹⁶ Institute of Biophysics, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, P.O.B. 521, H-6701 Szeged, Hungary.

Répercussions précoces de l'hypothyroïdie sur la synaptogenèse dans le cortex cérébelleux du Rat nouveau-né

L'hypothyroïdie entraîne, chez le jeune Rat, un ralentissement de l'augmentation de la densité des synapses dans la couche moléculaire du cortex cérébelleux. Selon NICHOLSON et ALTMAN¹, la différence ne devient significative qu'après l'âge de 15 jours, mais dans un travail précédent² nous l'avions trouvée déjà importante et hautement significative à l'âge de 14 jours. Par ailleurs les répercussions les plus nettes de l'hypothyroïdie sur la maturation histologique du cortex cérébelleux s'observent pendant la deuxième semaine post-natale³⁻⁵, et, pendant la première semaine, on note déjà des effets de la déficience thyroïdienne sur la maturation biochimique de l'organe^{3,6-8}. De plus, un ralentissement de l'augmentation de la fraction synaptosomique du cervelet, estimée d'après son contenu en protéines, a été mis en évidence dès

l'âge de 10 jours chez l'animal hypothyroïdien⁹. L'ensemble de ces données et plus particulièrement la dernière, joint

¹ J. L. NICHOLSON et J. ALTMAN, Science 176, 530 (1972).

² A. REBIERE et J. LEGRAND, C.R. Acad. Sci., Paris 276, 2317 (1972).

³ J. CLOS, F. CREPEL, C. LEGRAND, J. LEGRAND, A. RABIE et E. VIGOUROUX, Gen. comp. Endocr. 23, 178 (1974).

⁴ J. LEGRAND, Archs. Anat. microsc. Morph. exp. 56, 205 (1967).

⁵ A. REBIERE et J. LEGRAND, Archs Anat. microsc. Morph. exp. 61, 105 (1972).

⁶ J. DAINAT, A. REBIERE et J. LEGRAND, J. Neurochem. 17, 581 (1970).

⁷ J. GOURDON, J. CLOS, C. COSTE, J. DAINAT et J. LEGRAND, J. Neurochem. 21, 861 (1973).

⁸ J. CLOS, C.R. Acad. Sci., Paris 275, 2917 (1972).

⁹ A. RABIE et J. LEGRAND, Brain Res. 67, 267 (1973).

au fait que la présence de synapses a été observée dans la couche moléculaire du cervelet du Rat dès les premiers instants de la vie post-natale¹⁰, rendaient intéressante l'étude, dès la naissance, des répercussions éventuelles de l'hypothyroïdie sur la synaptogenèse dans cette couche du cortex cérébelleux.

L'étude a porté sur 40 rats Wistar de souche C.F. du C.N.R.S. élevés au laboratoire. La durée de la gestation, ainsi que le moment de la naissance, ont été soigneusement

contrôlés, et n'ont été utilisées que les portées mises bas le matin du 23ème jour suivant la nuit du coït. L'hypothyroïdie des jeunes a été réalisée par gavage quotidien de la mère au propylthiouracile à raison de 50 mg en suspension dans 2 ml d'eau, au moyen d'une sonde stomacale, à partir du 18ème jour de la gestation, au moment où la thyroïde foetale se met normalement à

¹⁰ M. P. DEL CERRO et R. S. SNIDER, Brain Res. 43, 581 (1972).

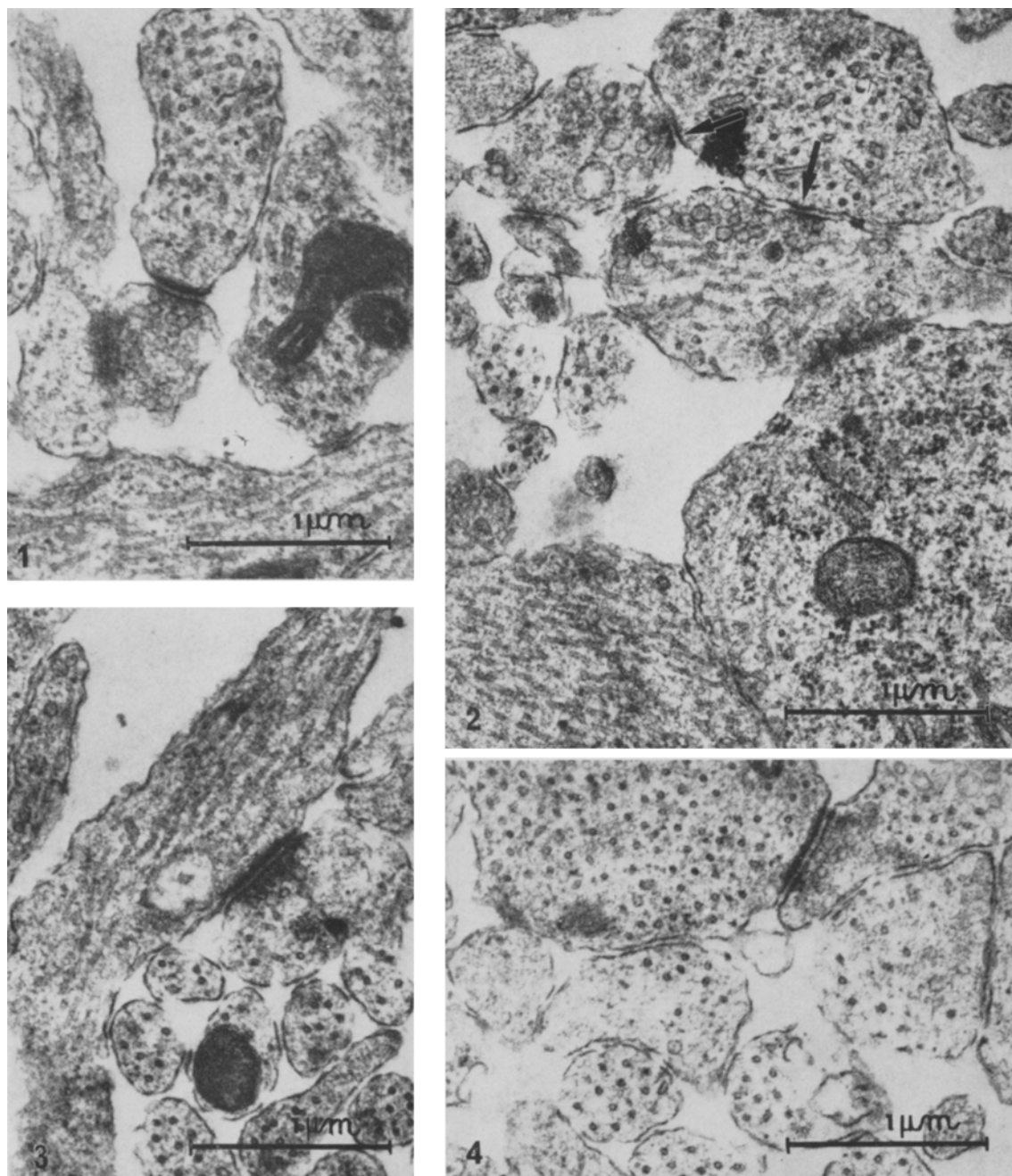


Fig. 1 à 4. Synapses dans la couche moléculaire du cortex cérébelleux de Rats nouveau-nés (âge = 0 jour). 1. Rat normal: La synapse est bien caractérisée. Noter l'épaississement post-synaptique plus développé que le pré-synaptique l'espace intersynaptique bien apparent et les nombreuses vésicules sphériques groupées près de la membrane présynaptique. 2. Rat hypothyroïdien: Contacts synaptiques dans la zone de la couche moléculaire voisine de la couche granulaire interne. Seules les 2 synapses marquées d'une flèche, qui présentent simultanément 2 épaississements denses séparés par un espace net et plus de 3 vésicules pré-synaptiques, ont été prises en compte pour l'évaluation de la densité des synapses. 3 et 4. Rat hypothyroïdien: Contacts synaptiques dans la zone de la couche moléculaire voisine de la couche granulaire externe. Les synapses présentent les mêmes caractères que chez l'animal normal.

fonctionner¹¹. Cette méthode provoque une forte hyperplasie des thyroïdes maternelles et fœtales en fin de gestation¹².

Méthodes. Dans les deux groupes d'animaux, et pour chaque stade, les jeunes appartenaient à 3 portées différentes. Les rats ont été anesthésiés à l'éther et sacrifiés par perfusion intracardiaque¹³, d'un mélange de glutaraldéhyde (3,83%) dans un tampon phosphate monosodique-hydroxyde de sodium, additionné de chlorure de calcium 1% à raison d'une goutte pour 50 ml de fixateur (pH 7,4). Les cervelets ont ensuite été immergés pendant 24 h dans le même fixateur puis disséqués. Les pièces ainsi prélevées ont été post-fixées au tétroxyde d'osmium 4% pendant 30 min, déshydratées aux alcools et incluses dans l'araldite. Les coupes fines ont été contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb puis observées au microscope JEM 100 B. Pour chaque animal les synapses ont été dénombrées dans la région superficielle du culmen et du déclive sur une portion de la couche moléculaire délimitée du côté interne par le soma d'au moins une cellule de Purkinje, et du côté externe par la couche interne des éléments de la couche granulaire externe. Cette portion de couche moléculaire constitue une bande perpendiculaire à la couche des cellules de Purkinje et à la couche granulaire externe. Dans cette bande sont pris 10 clichés répartis à peu près également dans les parties interne, médiane et externe de la zone moléculaire et couvrant au total 420 μm^2 . Seules les formations présentant simultanément 2 épaississements denses séparés par un espace d'environ 30 nm et au moins 3 vésicules présynaptiques d'environ 30 nm de diamètre ont été prises en compte¹⁴. Les animaux âgés de 0 jours ont été sacrifiés dans un délai de 1 à 6 h après la naissance.

Résultats. Chez les rats normaux (Figure 1) comme chez les rats rendus hypothyroïdiens (Figures 2, 3 et 4), la couche moléculaire du cortex cérébelleux renferme des synapses dès le jour de la naissance. Dans les 2 groupes d'animaux, la densité des synapses s'accroît avec l'âge (Tableau).

Dès la naissance la densité des synapses est plus faible chez les animaux hypothyroïdiens que chez les animaux normaux et la différence est devenue significative à l'âge de 5 jours. Chez les animaux hypothyroïdiens, l'inhibition de la synaptogenèse augmente avec l'âge jusqu'à 10 jours, stade auquel la densité des synapses est réduite d'environ 60%. Un travail précédent² avait montré que cette inhibition reste aussi importante à 14 jours, mais qu'il y a ensuite une certaine récupération.

Il est intéressant de constater que l'inhibition de la synaptogenèse accompagnant l'hypothyroïdie atteint sa valeur maximum pendant la fin de la deuxième semaine post-natale, c'est à dire au moment où l'évolution normale des structures cérébelleuses est la plus rapide et où le retard de la maturation histologique de l'organe chez l'animal hypothyroïdien est le plus important, où l'aspect et le comportement du jeune Rat se transforment le plus profondément et où les signes extérieurs du crétinisme expérimental deviennent très nets chez l'animal privé d'hormones thyroïdiennes⁴. C'est aussi le moment où la concentration plasmatique de la thyroxine¹⁵⁻¹⁷ et le turnover de l'hormone^{3,16} sont normalement maximaux.

Des études électrophysiologiques ont montré que des contacts fibres parallèles-cellules de Purkinje sont fonctionnels à l'âge de 3 ou 4 jours chez le jeune Rat normal^{18,19} comme chez l'animal hypothyroïdien²⁰ et les premières observations en microscopie électronique n'avaient pu mettre en évidence, chez l'animal normal, la présence de contacts synaptiques dans la couche moléculaire avant le même âge¹⁹. Or il est confirmé ici, à la suite des travaux de DEL CERRO et SNIDER¹⁰, que la synaptogenèse débute au contraire dès la naissance et probablement même avant. Il est à remarquer que nous avons comme DEL CERRO et SNIDER utilisé la coloration classique à l'acétate d'uranyle et citrate de plomb et non la technique à l'éthanol-acide phosphotungstique de BLOOM et AGHAJANIAN²¹ qui n'avait pas permis à WOODWARD et al.¹⁹ d'obtenir des résultats positifs sur des animaux nouveau-nés.

Il est montré de plus que la déficience thyroïdienne entraîne dès la naissance une inhibition de la synaptogenèse, ce qui constitue sa manifestation la plus précoce actuellement mise en évidence dans la maturation structurale du cervelet. Il s'agit là d'un argument en faveur d'une action spécifique des hormones thyroïdiennes sur l'établissement des synapses.

La conception selon laquelle les retards et les anomalies de la croissance et de la ramification des prolongements des neurones provoqués par l'hypothyroïdie entraîneraient une réduction de leur probabilité d'interaction fonctionnelle^{22,23} semble donc pouvoir être complétée. En effet, puisque le nombre de contacts synaptiques est diminué bien avant que ne se manifestent les anomalies de la morphogenèse des neurones, ces dernières pourraient être autant la cause que la conséquence d'une compétence synaptogénétique anormale de la part des neurones immatures.

Densité des synapses* dans la couche moléculaire

Age (jours)	Animaux normaux	Animaux hypothyroïdiens
0	6,75 \pm 1,03 (4)	4,20 \pm 1,01 (5)
5	9,80 \pm 0,80 (5)	5,66 \pm 0,42 ^b (6)
7	15,60 \pm 0,74 ^c (5)	8,20 \pm 0,58 ^{b,c} (5)
10	21,60 \pm 2,78 (5)	9,20 \pm 1,77 ^b (5)

* Nombre moyen de synapses pour 420 $\mu\text{m}^2 \pm$ Erreur Standard. Entre parenthèses le nombre d'animaux étudiés. ^b Différence significative avec les animaux normaux de même âge ($p < 0,01$), test t de Student. ^c Au sein d'une même catégorie d'animaux, différence significative avec les animaux du stade précédent ($p < 0,01$).

¹¹ J. P. GELOSO, C.r. Soc. Biol., Paris 155, 1239 (1961).

¹² A. JOST, Rev. Suisse Zool. 64, 821 (1957).

¹³ C. TESTA et F. ROGER, 4th Europ. Reg. Conf. on Electr. Microsc. (Rome 1968), p. 529.

¹⁴ M. ARMSTRONG-JAMES et R. JOHNSON, Z. Zellforsch. 110, 559 (1970).

¹⁵ M. SAMUEL, Gen. comp. Endocr. 10, 229 (1968).

¹⁶ E. VIGOUROUX, Gen. comp. Endocr. 18, 628 (1972).

¹⁷ S. J. WISOCKI et W. SEGAL, Eur. J. Biochem. 28, 183 (1972).

¹⁸ F. CREPEL, Expl. Brain Res. 14, 463 (1972).

¹⁹ D. J. WOODWARD, B. J. HOFFER, G. R. SIGGINS et F. E. BLOOM, Brain Res. 34, 73 (1971).

²⁰ F. CREPEL, Expl. Brain Res. 14, 472 (1972).

²¹ F. E. BLOOM et G. K. AGHAJANIAN, J. Ultrastruct. Res. 22, 301 (1968).

²² J. T. EAYRS, in *Structure and Function of the Cerebellar Cortex* (Eds. D. B. TOWER et J. P. SCHADE; Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1960), p. 43.

²³ J. T. EAYRS, Lect. scient. Basis Med. 14, 317 (1966).

Enfin, ces résultats posent le problème d'une influence de la déficience thyroïdienne sur la maturation du système nerveux s'exerçant déjà pendant la période foetale, même chez une espèce comme le Rat, dont le degré d'immaturité nerveuse est particulièrement grand à la naissance.

Summary. Synaptogenesis is already under way in the cerebellum of the rat immediately after birth. The synaptic contacts are defined by the simultaneous occurrence of 2 membranous thickenings, an intervening gap, and a minimum of 3 presynaptic vesicles. A difference in synapse concentration per area of section for animals born of thyroid-inhibited mothers as compared to normal controls is demonstrated. Synaptogenesis is delayed by thyrodepressive treatment immediately after birth.

A. REBIERE^{24, 25}

²⁴ Je remercie le Professeur J. LEGRAND pour sa participation à la discussion et à la rédaction de cet article ainsi que F. CARUSO qui a réalisé son illustration.

²⁵ Ce travail a été financé par la D.G.R.S.T., contrat No. 72.7.0102.

Laboratoire de Neurobiologie, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, F-34060 Montpellier Cedex (France), 14 Juin 1974.

Effect of Decapacitation Factor on the Oxygen Uptake of Rabbit Spermatozoa Recovered from the Uterus

Rabbit spermatozoa must reside in the female reproductive tract for several hours before they can penetrate and fertilize an ovum^{1,2}. This capacitation process may involve removal, probably by enzymic action, of material located on the surface of the spermatozoa; re-exposure of the spermatozoa to seminal plasma leads to loss of capacitation and the process may well involve the restoration of the surface layer or decapacitation factor which normally coats the spermatozoa as they pass through the epididymis³⁻⁶.

Several workers have recovered spermatozoa from the uterus of rabbits and compared their metabolism with those from fresh samples of semen⁷⁻⁹. Both the oxygen uptake and glycolytic activity of the spermatozoa appears to be increased after incubation in the uterus and there is also evidence of some switch to pentose shunt activity, as judged by a decrease in the ratio of ¹⁴CO₂ from 6-¹⁴C glucose and 1-¹⁴C glucose when these are used as substrate for the spermatozoa. The greatest increase in the oxygen uptake of spermatozoa took place between the 4th and 6th h of incubation in utero and since rabbit spermatozoa require about 6 h to become capacitated in the uterus it is tempting to suggest that these metabolic changes may be associated with the process.

One possible criticism of this type of work is that the semen suspensions recovered from the uterus are contamination with leucocytes and other extraneous cells that might influence the results. In the experiments reported in this paper the washed spermatozoa suspensions have been sealed into Millipore tubes before placing the suspension into the uterus of does. This system was also used to study the effect of adding decapacitation factor to the spermatozoa suspension after recovery from the uterus, in expectation that the decapacitation factor might decrease the oxygen uptake of the spermatozoa suspension.

¹ C. R. AUSTIN, Aust. J. Sci. Res. B, 4, 581 (1951).

² M. C. CHANG, Nature 168, 697 (1951).

³ M. C. CHANG, Nature 179, 258 (1957).

⁴ J. M. BEDFORD and M. C. CHANG, Amer. J. Physiol. 202, 179 (1962).

⁵ D. F. WEINMAN and W. L. WILLIAMS, Nature 203, 423 (1964).

⁶ W. L. WILLIAMS, T. O. ABNEY, H. N. CHERNOFF, W. R. DUKELOW and M. C. PINSKER, J. Reprod. Fert. Suppl. 2, 11 (1967).

⁷ C. E. HAMNER and W. L. WILLIAMS, J. Reprod. Fert. 5, 143 (1963).

⁸ M. S. MOUNIB and M. C. CHANG, Nature, Lond. 207, 943 (1964).

⁹ R. N. MURDOCH and I. G. WHITE, J. Reprod. Fert. 14, 213 (1967).

Oxygen consumption by spermatozoa ($\mu\text{l O}_2/\text{h}/10^8$ spermatozoa)

	Mean \pm SE
Experiment 1 ($n = 6^a$)	
Spermatozoa from fresh semen	11.0 \pm 3.49
Spermatozoa after incubation in the uterus	25.8 \pm 9.42
Spermatozoa after incubation in the uterus, decapacitation factor added ^b	69.6 \pm 39.44
Experiment 2 ($n = 3$)	
Spermatozoa from fresh semen	10.0 \pm 5.24
Spermatozoa from fresh semen, decapacitation factor added ^b	8.5 \pm 4.15
Experiment 3 ($n = 5$)	
Spermatozoa from fresh semen	9.2 \pm 3.01
Spermatozoa from fresh semen, bovine serum albumin added ^b	10.7 \pm 2.63

^a n , Number of replicates. ^b Decapacitation factor (10 or 5 mg) or bovine serum albumin (10 mg) were added to the sample chamber of the oxygen electrode.