



**HAL**  
open science

## Comparaison de deux méthodes de mesure de flux de nutriments à l'interface eau-sédiment:méthode des peepers et méthode des chambres benthiques

Christian Grenz, Thierry Moutin, Bernadette Picot, Henry Massé

### ► To cite this version:

Christian Grenz, Thierry Moutin, Bernadette Picot, Henry Massé. Comparaison de deux méthodes de mesure de flux de nutriments à l'interface eau-sédiment:méthode des peepers et méthode des chambres benthiques. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie, 1991, 313, pp.239-244. hal-02178810

**HAL Id: hal-02178810**

**<https://hal.science/hal-02178810>**

Submitted on 10 Jul 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Comptes rendus de  
l'Académie des sciences.  
Série 3, Sciences de la vie

Académie des sciences (France). Auteur du texte. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie. 1991-07.

**1/** Les contenus accessibles sur le site Gallica sont pour la plupart des reproductions numériques d'oeuvres tombées dans le domaine public provenant des collections de la BnF. Leur réutilisation s'inscrit dans le cadre de la loi n°78-753 du 17 juillet 1978 :

- La réutilisation non commerciale de ces contenus est libre et gratuite dans le respect de la législation en vigueur et notamment du maintien de la mention de source.

- La réutilisation commerciale de ces contenus est payante et fait l'objet d'une licence. Est entendue par réutilisation commerciale la revente de contenus sous forme de produits élaborés ou de fourniture de service.

[CLIQUER ICI POUR ACCÉDER AUX TARIFS ET À LA LICENCE](#)

**2/** Les contenus de Gallica sont la propriété de la BnF au sens de l'article L.2112-1 du code général de la propriété des personnes publiques.

**3/** Quelques contenus sont soumis à un régime de réutilisation particulier. Il s'agit :

- des reproductions de documents protégés par un droit d'auteur appartenant à un tiers. Ces documents ne peuvent être réutilisés, sauf dans le cadre de la copie privée, sans l'autorisation préalable du titulaire des droits.

- des reproductions de documents conservés dans les bibliothèques ou autres institutions partenaires. Ceux-ci sont signalés par la mention Source gallica.BnF.fr / Bibliothèque municipale de ... (ou autre partenaire). L'utilisateur est invité à s'informer auprès de ces bibliothèques de leurs conditions de réutilisation.

**4/** Gallica constitue une base de données, dont la BnF est le producteur, protégée au sens des articles L341-1 et suivants du code de la propriété intellectuelle.

**5/** Les présentes conditions d'utilisation des contenus de Gallica sont régies par la loi française. En cas de réutilisation prévue dans un autre pays, il appartient à chaque utilisateur de vérifier la conformité de son projet avec le droit de ce pays.

**6/** L'utilisateur s'engage à respecter les présentes conditions d'utilisation ainsi que la législation en vigueur, notamment en matière de propriété intellectuelle. En cas de non respect de ces dispositions, il est notamment passible d'une amende prévue par la loi du 17 juillet 1978.

**7/** Pour obtenir un document de Gallica en haute définition, contacter [utilisation.commerciale@bnf.fr](mailto:utilisation.commerciale@bnf.fr).

## Comparaison de deux méthodes de mesure de flux de nutriments à l'interface eau-sédiment : méthode des peepers et méthode des chambres benthiques

Christian GRENZ, Thierry MOUTIN, Bernadette PICOT et Henri MASSÉ

**Résumé** — Une comparaison de mesures de flux de nutriments à l'interface eau-sédiment selon deux techniques différentes a été effectuée en juillet 1990, dans l'étang du Prévost (zone lagunaire méditerranéenne peu profonde). Un facteur de 5 pour le flux de  $\text{NH}_4^+$  et de 30 environ pour le flux de  $\text{PO}_4$  entre la méthode des peepers basée sur le calcul du flux à partir des gradients de concentration dans l'eau interstitielle et la méthode des chambres benthiques posées sur le sédiment, a été estimé, les flux dans les chambres benthiques étant toujours les plus forts.

### Comparison between peepers- and benthic chamber methods for the measurement of nutrient fluxes at the water-sediment interface

**Abstract** — A comparison between two methods of sediment water fluxes measurement was undertaken in July 1990, in the Etang du Prévost (shallow Mediterranean lagoon). A ratio of 5 for  $\text{NH}_4^+$  fluxes and 30 for  $\text{PO}_4$  fluxes between the peepers and the benthic chamber methods was estimated. This discrepancy shows clearly the necessity to define a standardization coefficient permitting further on the intercomparison between data from the literature.

**Abridged English Version** — In shallow water, large amounts of organic matter settle down to the bottom and the nutrient exchange across the sediment-water interface strongly influences the nutrient chemistry of the water column, enhancing productivity in the overlying water ([1] to [4]). The literature includes a great number of flux measurement methods intended for specific purposes and locations. The purpose of our study was to compare results from flux measurements by using two different methods: a benthic chamber method and a gradient method using interstitial water sampling (peeper). The field experiment was performed in July 1990 in the Etang du Prévost, a Mediterranean lagoon in southern France.

**MATERIAL AND METHODS.** — The Etang du Prévost is a shallow lagoon (mean depth 0.8 m) ecosystem, mainly controlled by marine and terrestrial waste water inputs, which suffers periodical eutrophication events [5]. The area is  $2.9 \times 10^6 \text{ m}^2$  and the volume  $2.4 \times 10^6 \text{ m}^3$ .

**Interstitial water sampling (peeper).** — Firstly used by Hesslein [6] and others ([7] to [9]) this method avoids oxygen contamination during sampling. Five "peepers" (Fig. 1, a) were pressed into the sediment and recovered after 15 days. The water in the cavities was sampled with a vacuum syringe (Vacutainer tubes) and stored at 4°C prior to ammonium and phosphate analysis using a Technicon-Analyser [10]. Fluxes were calculated using concentration gradients in the upper 10 cm layer of the sediments and a modified Fick's first law in which the free-water diffusion coefficient is corrected for tortuosity and here depends on sediment characteristics ([11], [12]). The chosen diffusion coefficients were equal to  $0.683 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$  for  $\text{PO}_4$  and  $1.47 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$  for  $\text{NH}_4^+$  according to Reddy *et al.* [13].

**Benthic chamber methods.** — Seven polyacrylic hemispheres with a diameter of 39.5 cm, covering  $0.1225 \text{ m}^2$  (Fig. 1, b) and isolating water volume of about 17 l, were used in the same field conditions as the peepers. Fluxes were estimated from the diurnal variations of nutrient content [17].

Note présentée par Jean-Marie PÉRÈS.

RESULTS. — The fluxes showed large variations, emphasizing the need for replicate observations (Figs. 2, 3). Estimated fluxes were respectively  $5.5 \pm 3.1 \mu\text{mol PO}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  and  $98.2 \pm 32.7 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  for the “peeper” method and  $149.0 \pm 44.7 \mu\text{mol PO}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  and  $489.5 \pm 106.2 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  for the benthic chamber method. Discrepancies between the methods were expressed as benthic chamber versus “peeper” flux ratio; values were up to 27 for  $\text{PO}_4$  and 5 for  $\text{NH}_4^+$  fluxes.

DISCUSSION AND CONCLUSION. — Studies dealing with pelagic-benthic coupling are very abundant ([4], [18] to [23]) but there are few published intercalibration studies of flux measurements. Hopkinson [4] showed a ratio of 2.2 to 10.5 between  $\text{NH}_4^+$  fluxes measured by the two methods. The mean discrepancy of 5.2 is similar to our values for  $\text{NH}_4^+$  (5).

Elderfield *et al.* [24] found a  $\text{PO}_4$  ratio varying between 1 and 8, using a gradient method based on interstitial water extracted from sediment cores. This ratio is less than the one we calculated (27). These differences have to be related to specific spatial and temporal scales of observations. The method using vertical gradient integrates long-term variations whereas time gradient method is a punctual measurement integrating spatial heterogeneity. It suggests that the method to be used has to be determined in function of the purpose of the study. In terms of nutrient exchange at the sediment-water interface, the benthic chamber method seems to be suitable. At this stage of our study, a calibration coefficient between the results of both methods could not be established, so further experiments have to be performed.

---

INTRODUCTION. — Parmi les problèmes fondamentaux que pose le littoral, celui de l'interaction entre la production de matière organique et la qualité de l'environnement, est particulièrement important. En effet, l'accumulation de matière organique en milieu littoral induit le problème de sa destinée à court et à moyen terme [1]. Il s'agit de savoir si cette accumulation de matière organique peut être génératrice de pollution au sens large : accumulation de composés xénobiotiques ou déclenchement de crises dystrophiques liées à l'excès de nutriments pour le compartiment pélagique [2].

Du fait de la faible profondeur, en particulier dans les estuaires et lagunes, les processus de recyclage dans le compartiment benthique vont avoir une influence importante sur la dynamique des nutriments dans le compartiment pélagique et, par voie de conséquence, sur la productivité des eaux susjacentes ([3], [4]). Les techniques utilisées pour les mesures de flux de nutriments à l'interface eau-sédiment sont nombreuses et variées. Ainsi, la comparaison des résultats de ces mesures en devient délicate. Parmi ces méthodes, la mesure des flux en chambres benthiques posées sur le fond et celle estimée à partir des gradients de concentration dans l'eau interstitielle du sédiment (« peepers ») sont les plus utilisées. Le but de cette étude est donc de confronter les résultats de mesures de flux de nutriments à l'interface eau-sédiment obtenues parallèlement par ces deux méthodes sur un même site, une lagune méditerranéenne, à une période de forte productivité.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Présentation du site.* — Situé à l'ouest de Palavas, l'étang du Prévost est marqué par la dominance des apports marins (90 %) [5]. Les apports d'eaux usées sont plus importants que dans d'autres étangs palavasiens quand on les rapporte à la superficie de l'étang, et les crises dystrophiques plus marquées et plus fréquentes, surtout dans la région proche du grau. La surface de cet étang est de

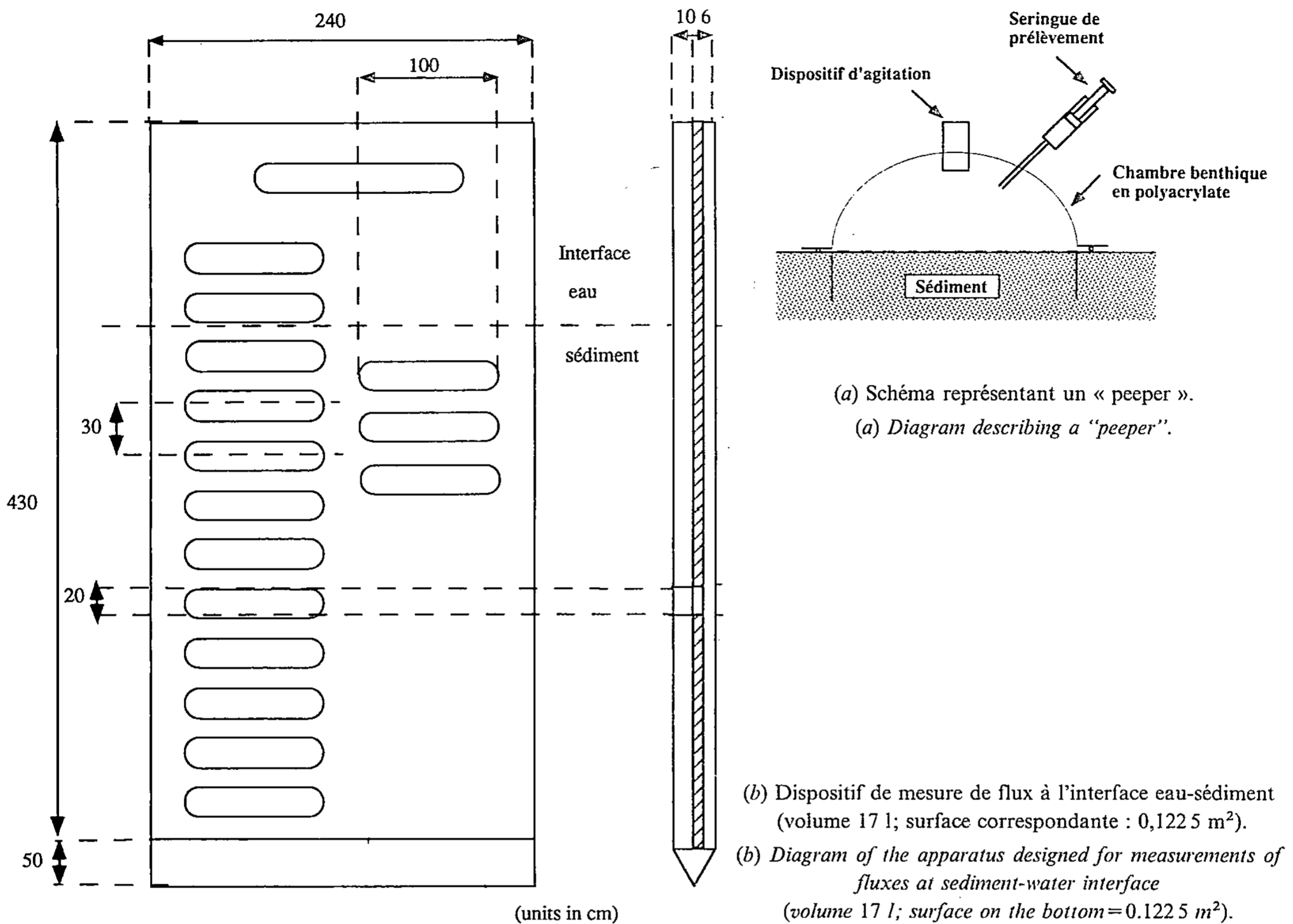


Fig. 1

$2,9 \cdot 10^6 \text{ m}^2$  pour une profondeur moyenne de 0,80 m (maximum : 1,50) et un volume moyen de  $2,4 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ .

*Méthode des « peepers ».* — *Prélèvement de l'eau interstitielle.* — Différentes méthodes de prélèvement de l'eau interstitielle existent de nos jours. Pour la séparer des sédiments, la centrifugation est très souvent employée, mais de mise en place relativement lourde de par les précautions à prendre (principalement, travail sous atmosphère inerte). On lui préfère de plus en plus une méthode de séparation *in situ*, notamment pratiquée à l'aide de dispositifs munis de logettes renfermant de l'eau distillée ou « peepers » (fig. 1, a). Introduite par Hesslein [6], cette méthode a été utilisée entre autres par Carignan [7], Van Eck et Smith [8], et Enell et Löfgren [9]. Les précautions à prendre, quant à l'emploi de « peepers », sont principalement d'utiliser une membrane en polysulfone inerte pour éviter les risques de développement bactérien [7] et de désoxygéner l'eau des différentes cellules par un bullage d'azote avant l'insertion dans les sédiments. 15 jours d'équilibrage sont nécessaires avant de retirer les « peepers »; puis on récupère l'eau des différentes logettes par seringue et on l'introduit dans des tubes Vacutainer afin de la conserver à l'abri de l'oxygène. Les échantillons sont conservés à +4°C avant d'effectuer l'analyse des sels nutritifs sur un autoanalyseur « Technicon » [10].

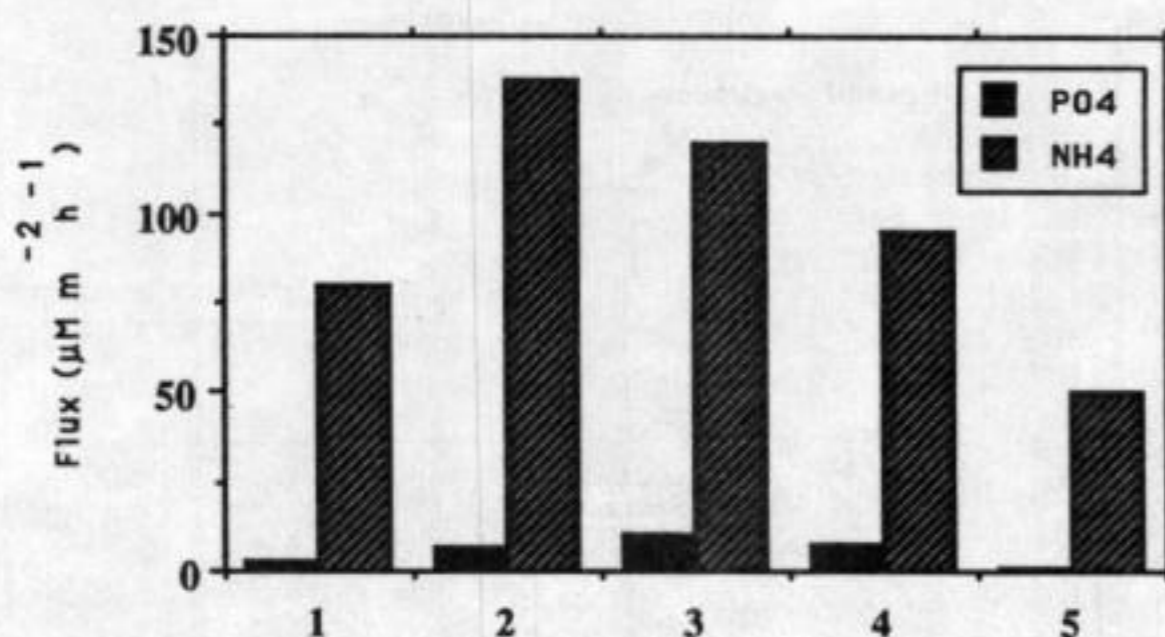


Fig. 2

Fig. 2. — Valeur des flux obtenus pour cinq « peepers ».

Fig. 2. — Values of fluxes measured with five peepers.

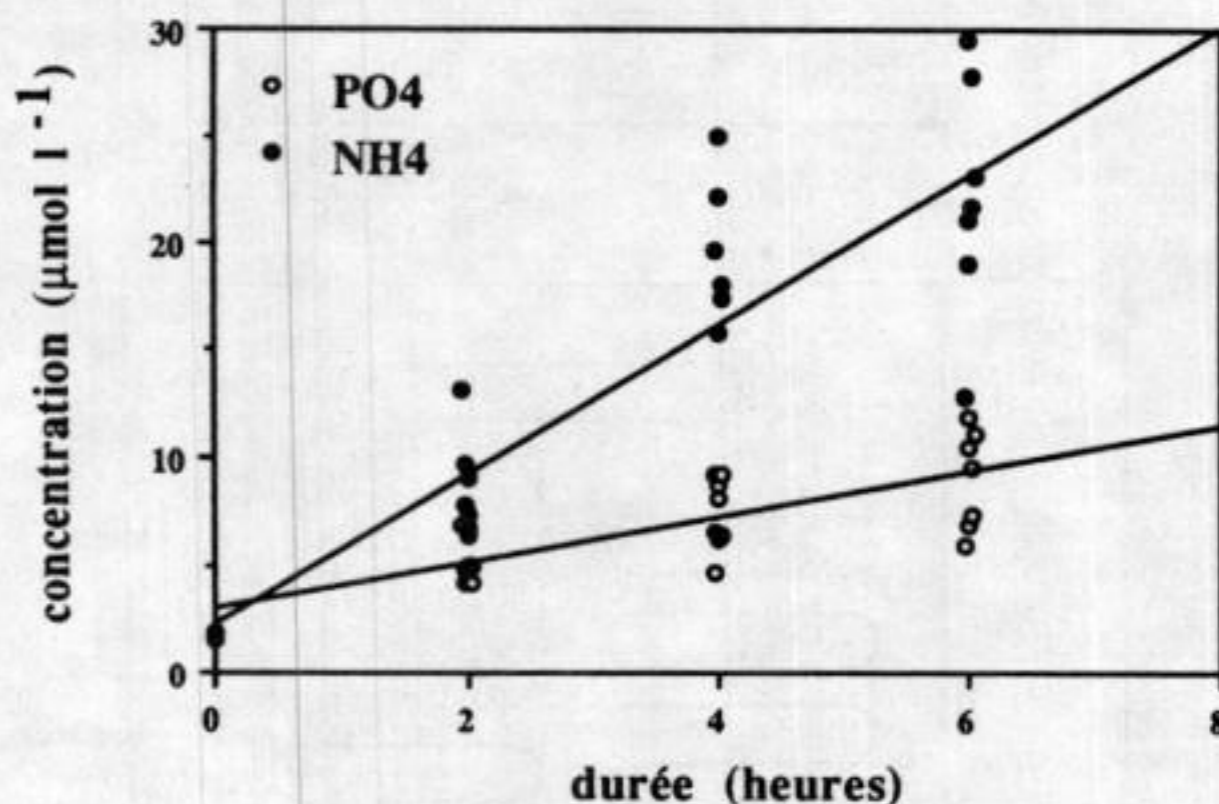


Fig. 3

Fig. 3. — Évolution des concentrations de l'ammonium et du phosphate dans les sept chambres benthiques.

Fig. 3. — Evolution of ammonia and phosphate concentration in the seven benthic chambers.

*Calcul des flux.* — A partir des gradients de concentration obtenus à l'aide des « peepers » et en considérant les sédiments comme des liquides fortement concentrés, on peut appliquer la première loi de Fick sur la diffusion en solution aqueuse, légèrement modifiée ([11], [12]). Au coefficient de diffusion en solution infiniment diluée va être apporté un terme correctif caractéristique du sédiment.

$$D_s = D/\vartheta^2$$

$D_s$  : coefficient de diffusion dans les sédiments;

$D$  : coefficient de diffusion en solution infiniment diluée;

$\vartheta$  : tortuosité.

La tortuosité peut être exprimée en fonction de la porosité et d'un facteur de correction dépendant à la fois de la résistivité électrique des sédiments et de celle de l'eau interstitielle. Enell et Löfgren [9] donnent un tableau des valeurs de  $D_{s_{PO_4}}$  utilisées pour calculer un flux diffusif dans les sédiments ( $0,095 < D_{s_{PO_4}} < 0,924 \text{ cm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ). Les valeurs utilisées par la suite seront celles proposées par K. R. Reddy et coll. [13] dans leur étude sur le lac Apopka qui, de par ses caractéristiques (hypereutrophe, faible profondeur), ressemble fortement aux étangs palavasiens, à savoir :  $D_{s_{PO_4}} = 0,683 \text{ cm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$  et  $D_{s_{NH_4}} = 1,47 \text{ cm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ .

Pour tenir compte du fait que l'on exprime le gradient de concentration en fonction de la concentration de l'eau interstitielle, on doit tenir compte de la porosité et l'expression finale est la suivante :  $J_s = -\varphi D_s (dC_i/dx)$ .

Le gradient de concentration est obtenu en effectuant une régression linéaire sur les sept mesures effectuées juste au-dessous de la surface du sédiment (environ 10 cm). La diffusion dans les sédiments est supposée être le processus qui limite le relargage, les phénomènes de turbulence pouvant donner ponctuellement un flux beaucoup plus important. L'hypothèse de base est que l'équilibre entre la phase solide et l'eau interstitielle est toujours réalisé.

*Méthode des chambres benthiques.* — L'appareillage mis au point pour la mesure des flux dérive de ceux utilisés par de nombreux auteurs ([14] à [16]). Il se présente sous la forme d'enceintes hémisphériques en polyacrylate transparent (39,5 cm de diamètre

— volume réel mesuré 171) (*fig. 1 b*). L'évolution dans les enceintes des concentrations de sels nutritifs ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) est mesurée en fonction du temps (pas d'échantillonnage de 2 h pendant des cycles diurnes de 6 h). Les flux sont calculés à partir de ces évolutions, connaissant la surface au sol des enceintes et leur volume [17].

RÉSULTATS. — Les valeurs de flux obtenues selon la méthode des « peepers » sont représentées sur la figure 2 et celles selon la méthode des chambres benthiques sur la figure 3.

On note dans chacun des cas une certaine hétérogénéité, ce qui souligne la nécessité de multiplier les observations quelle que soit la technique utilisée. En effectuant la moyenne des flux nous obtenons, pour la méthode des « peepers », un flux de  $5,5 \pm 3,1$  et  $98,2 \pm 32,7 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  respectivement pour le  $\text{PO}_4$  et pour  $\text{NH}_4^+$ . Par la méthode des chambres benthiques la moyenne des flux correspond à  $149 \pm 44,7$  et  $489,5 \pm 106,2 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  respectivement pour le  $\text{PO}_4$  et pour  $\text{NH}_4^+$ . Il existe donc un rapport de 27 entre les méthodes de mesures de flux de  $\text{PO}_4$  et un rapport de 5 pour les résultats de  $\text{NH}_4^+$ .

DISCUSSION. CONCLUSION. — Les études portant notamment sur le rôle des flux benthiques dans la demande des producteurs primaires pélagiques sont nombreuses ([4], [18] à [23]). A notre connaissance, une comparaison de méthodes telle qu'elle est réalisée ici, n'a pas été effectuée. Quelques auteurs ont fait des comparaisons entre flux mesurés à l'interface et estimés à partir des concentrations dans l'eau interstitielle extraite de sédiment. Hopkinson [4] signale un rapport entre flux de  $\text{NH}_4$  estimés et mesurés variant de 2,2 à 10,5 selon la saison, soit en moyenne 5,2 pour un sédiment sableux dans la zone littorale de Georgia Bight. De même, Elderfield et coll. [24] estiment en période estivale un rapport de 1 à 3,5 pour les flux d'ammonium et de 1 à 8 pour les flux de phosphate dans le cas des sédiments du Nord de la baie de Narragansett (U.S.A.). Ces auteurs attribuent cette différence principalement à l'activité bioturbatrice de la faune benthique. Nos résultats vont dans le sens de ceux décrits par ces derniers auteurs pour ce qui est de l'ammonium. En revanche, le rapport entre les résultats estimés et mesurés de flux de  $\text{PO}_4$  est bien plus élevé dans notre cas. L'effet « bioturbation » n'est probablement pas le facteur déterminant de la divergence. En raison de la consommation d'une partie des nutriments par la microflore benthique pendant la période d'éclairement, les flux mesurés en période diurne, sont généralement sous estimés ([25], [26]). La divergence entre les résultats des deux méthodes est d'autant plus grande. La mesure des flux dans les chambres benthiques prend donc également en compte l'activité chimique et biologique du microfilm de surface qui est le résultat de processus non discernables par la méthode des « peepers ». En l'occurrence, la présence à l'interface eau-sédiment de fer à l'état oxydé ou réduit peut, selon le cas, bloquer ou non le relargage des phosphates vers la colonne d'eau [9]. Ce résultat pose le problème, d'une part, des échelles spatio-temporelles des phénomènes observés et d'autre part, des processus impliqués dans le recyclage des nutriments. En effet, la technique des « peepers », unidimensionnelle, intègre des phénomènes à long terme alors que la mesure des flux en chambre benthique est ponctuelle dans le temps, mais concerne une superficie de sédiment plus vaste qui intègre l'hétérogénéité spatiale naturelle. Ces deux techniques présentent chacune un avantage certain, mais leur emploi dépend largement de la nature du problème abordé. Si l'on s'intéresse à l'aspect dynamique du devenir de la matière organique dans les sédiments, la méthode des « peepers » paraît plus adéquate. En revanche, si l'on s'intéresse plus



précisément aux conséquences de l'activité du sédiment en termes d'échanges à l'interface eau-sédiment, la technique des chambres benthiques semble plus appropriée. Les résultats de cette étude sur la base d'une seule comparaison ne permettent pas de définir un coefficient de standardisation entre les deux méthodes. Des observations supplémentaires seront réalisées dans ce but. Les résultats attendus de cette intercalibration, s'ils sont probants, devraient servir à une comparaison plus aisée des résultats issus de la littérature et de permettre le choix d'une méthode en fonction des sites étudiés.

Note remise le 3 avril 1991, acceptée après révision le 3 juillet 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] P. A. WILDE (de) et J. J. BEUKEMA, *Neth. Institute for Sea Res.*, Pub. Ser., 10, 1984, p. 145-148.
- [2] P. N. KLOSE, In: *Estuarine Perspectives*, V. S. KENNEDY éd., Academic Press, New York, 1980, 533 p.
- [3] S. W. NIXON, In: B. J. NELSON et L. E. CRONIN éd., *Estuaries and nutrients*, The Humana Press, Clifton, New Jersey, 1981, p. 111-138.
- [4] C. S. HOPKINSON Jr, *Mar. Biol.*, 94, 1987, p. 127-142.
- [5] I.A.R.E., *Les espaces lagunaires du Languedoc Roussillon : connaissance et aménagement*, Institut des aménagements régionaux et de l'environnement. Conseil Régional, 1990, p. 95.
- [6] R. H. HESSLEIN, *Limnol. Oceanogr.*, 21, 1976, p. 912-914.
- [7] R. CARIGNAN, *Limnol. Oceanogr.*, 22, (3), 1984, p. 667-670.
- [8] G. Th. M. VAN ECK et J. G. C. SMITH, In: P. G. SLY éd., *Sediment and water interactions*, 1986, p. 289-301.
- [9] M. ENELL et S. LÖFGREN, *Hydrobiologia*, 170, 1988, p. 103-132.
- [10] M. TRÉGUER et P. LE CORRE, *Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (utilisation de l'autoanalyseur Technicon IIR)*, 2nd éd., Univ. Bretagne Occidentale, 1975, 100 p.
- [11] A. LERMAN, *Ann. Rev. Earth Planet Sci.*, 6, 1978, p. 281-303.
- [12] M. D. KROM et R. A. BERNER, *Limnol. Oceanogr.*, 25, (2), 1980, p. 327-337.
- [13] K. R. REDDY, P. A. MOORE, M. M. FISHER et D. A. GRAETZ, *5th International Symposium on the interactions between sediment and water*, Uppsala, Sweden, 6-9 août 1990.
- [14] M. V. PROPP, V. G. TRARASOFF, I. I. CHERBADGI et LOOTZIK, In: *Marine benthic dynamics*, K. R. TENORE et B. C. COULL éd., Univ. of South Carolina Press, Columbia, South Carolina, 1980, p. 265-284.
- [15] P. HALL, *Ph. D. Thesis*, Univ. Gothenborg, 1984, 138 p.
- [16] G. BOUCHER et R. BOUCHER-RODONI, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 44, 1988, p. 229-238.
- [17] C. GRENZ, M. R. PLANTE-CUNY, R. PLANTE, E. ALLIOT, D. BAUDINET et B. BERLAND, *Oceanologica Acta*, 14, (2), 1991, p. 195-201.
- [18] E. O. HARTWIG, In: *Estuarine Processes*, M. WILEY éd., 1976, p. 103-117.
- [19] G. BILLEN, *Études écologiques des transformations de l'azote dans les sédiments marins*, *Thèse Doct. Sci.*, Univ. libre de Bruxelles, 1977, 266 p.
- [20] B. ZEITZSCHEL, In: K. R. TENORE et B. C. COULL éd., *Marine benthic dynamics*, Univ. South Carolina Press, Columbia, SC., 1980, p. 195-218.
- [21] T. R. FISHER, P. R. CARLSON et R. T. BARBER, *Est. Coast, Shelf Sci.*, 14, 1982, p. 101-116.
- [22] S. W. NIXON et M. E. Q. PILSON, In: E. J. CARPENTER et D. G. CAPONE éd., *Nitrogen in the marine environment*, Academic Press, N. Y., 1983, p. 565-648.
- [23] E. PAASCHE, In: T. H. BLACKBURN et J. SORENSSEN éd., *Nitrogen cycling in coastal marine environment*, SCOPE 33, Wiley and sons, 1988, p. 34-57.
- [24] M. ELDERFIELD, N. N. LUEDTKE, R. J. McCAFFREY et M. BENDER, *Am. J. Sci.*, 288, 1981, p. 768-787.
- [25] J. L. ESTEVES, *Réduction du nitrate dans les sédiments marins*, *Thèse 3<sup>e</sup> cycle*, Univ. Aix-Marseille-II, 1984, 107 p.
- [26] B. L. NOWICKI et S. W. NIXON, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 22, 1985, p. 21-30.

C. G. et H. M. : *Centre d'Océanologie de Marseille, Station marine d'Endoume, chemin de la Batterie-des-Lions, 13007 Marseille;*

T. M. et B. P. : *Faculté de Pharmacie, Département Sciences de l'Environnement et Santé publique, 11, avenue Charles-Flahault, 34060 Montpellier Cedex.*

## Biodisponibilité comparée du phosphore en fonction des substrats et de la fréquence des inondations dans trois forêts alluviales rhénanes de la plaine d'Alsace

Diane WEISS, Roland CARBIENER et Michèle TRÉMOLIÈRES

**Résumé** — Dans les forêts alluviales, la nutrition phosphorée est fortement influencée tant par la géochimie des alluvions que par l'hydromorphie des sols et la fréquence des inondations eutrophisantes. Une comparaison dans ce sens a été entreprise dans la plaine rhénane d'Alsace sur trois sites basiques (carbonatés calcaires, peu hydromorphes) des rives du Rhin dont l'un est régulièrement inondé, les deux autres ayant été mis hors eaux respectivement en 1860 et 1960. La comparaison est basée sur l'analyse foliaire de quatre espèces ligneuses (chêne, frêne, lierre et cornouiller) dans l'ensemble des sites étudiés. Les résultats montrent que le site inondable (île de Rhinau) offre, indépendamment de la géochimie du substrat, les meilleures conditions de nutrition phosphatée. À l'inverse le site soustrait depuis plus d'un siècle aux inondations offre les moins bonnes conditions de nutrition phosphatée. L'étude des contenus foliaires en P au cours de la saison de végétation montre des comportements spécifiques très marqués notamment en ce qui concerne la translocation du phosphore en fin de végétation. Par exemple le cornouiller sanguin, pourtant riche en phosphore stocke peu de réserves dans l'ensemble des sites.

### Effect of alluvium deposit geochemistry and flood frequency on phosphorus bioavailability in three alluvial rhine forests on the Alsace plain

**Abstract** — In alluvial forests, phosphorus nutrition is highly influenced by alluvium deposit geochemistry, soil colloids, hydromorphy and flood frequency. A comparison of the P bioavailability is under way in the Alsace Rhine plain in three basic sites (calcareous, weakly hydromorphic) of the Rhine banks. One is regularly flooded, the two others have not been flooded since 1860 and 1960 respectively. The comparison is based on leaf analysis of four ligneous species (oak, ash, dogwood and climbing ivy). The regularly flooded site offers the best conditions for P nutrition as compared with the site not flooded for more than a century. Each species shows a particular adaptive behaviour in P release at the leaf fall period depending on the sites. For example the "phosphatophilic" dogwood releases phosphorus in the whole site.

**Abridged English Version** — The Alsatian alluvial plain provides an ecological pattern for studying phosphorus bioavailability in rarely or regular flooded alluvial forests on calcic soils (20-30% CaCO<sub>3</sub>, pH 7.5-8.5) ([3], [4]). In the east, the Rhine runs through a carbonated alluvium deposit of Alpine fluvio-glacial origin. Its hydrological regime is nival with summer highwater.

On the basis of leaf analysis, the study compares the phosphorus bioavailability in the Rhine alluvial forests according to the presence or absence of regular flooding: one site (site one: Rhinau Island) is regularly flooded whereas the two others (site two: Breitsand Forest, and site three: Dachsenkopf Forest) have not been flooded since 1860 and 1960 respectively (Table I) [4]. In the Rhine alluvial forest, phosphate is precipitated in the form of tricalcic phosphate and/or hydroxyapatite and becomes theoretically unavailable to the vegetation, except when made soluble by means of transfer by symbiotic mycorrhiza ([12], [13], [14]). Under certain pH conditions and/or reduction potentials, precipitation is accelerated but phosphate may be soluble in the form of ferrous phosphate for example [2]. Again, maybe the deposit of soluble phosphate with flooding in summer could make phosphorus available to the vegetation; so there is no shortage of this mineral nutrient ([4], [9]). Four ligneous species are chosen: oak (*Quercus robur* L.), ash (*Fraxinus excelsior* L.), dogwood (*Cornus sanguinea* L.) and climbing ivy (*Hedera helix* L.). Using agronomic leaf diagnosis,

Note présentée par Paul OZENDA.

the leaves are analysed at different stages of maturity (young, mature and dead) to follow the evolution of the phosphorus content (P) and to observe the ecophysiological behaviour of every species.

During August, the mineral leaf content is quite stable for adult leaves (harvested in August) ([5], [10]). Our results show that adult leaves displayed no deficiency in mineral content, but in the regularly flooded site the P mineral content is much higher. Site 1 is the most fertile: it receives strong mineral nutrient contribution by flooded waters of the Rhine, rich in soluble phosphate ( $P-PO_4^{3-}$ ) to  $180 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) and by the groundwater ( $P-PO_4^{3-}$ :  $30-100 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) ([8], [9]). On the other hand, leaves from site 3, which have not been flooded regularly since 1860, show the lowest P mineral content (*Fig.*). This site presents unfavourable factors, *i. e.* low level of colloids and exchangeable cations, absence of regular flood. There the species as a whole store more phosphorus by translocation from leaves to the buds than in the other sites. Site 2 possesses fertilizing characteristics near those of site 1, but the absence of regular flood explain the P content between the first and the third site.

The results we obtained are considerably lower than Klimo's results, but he studied Czechoslovakian forests on acids soils [6], which demonstrates the role of the substrate. In spring, the leaves in all the sites have a high P mineral content; this means that phosphorous is available from plant storage and/or from soils; the ecophysiological behaviour of every species is decisive here: the *Cornus sanguinea* L. presents very specific behaviour and does not store phosphorus in any site. Its P mineral content quickly returns to the soil through the fallen leaves; this fact is interesting because it shows that *Cornus sanguinea*, a dominated species, is beneficial to dominant species, as shown with climbing ivy [15]. On the other hand, ivy stores P in perennial organs in any site. Oak and ash only release P in the fallen leaves in site 1 which is regularly flooded, but store it in the two other sites (Table II).

The results show the following:

- the importance of flooding which provides a supply of nutrients and masks the harmful effect of calcium carbonate with alkaline pH in Rhine site 1 ([8], [9]);
- the type of soil: the increasing content of argillaceous humic colloids (site 3 < site 2 < site 1) determines colloid phosphorous bioavailability;
- the specific behaviour towards phosphorous nutrition under these particular conditions.

---

INTRODUCTION. – Les formes du phosphore assimilables par les végétaux sont des phosphates, solubles dans la solution du sol ou adsorbés généralement à la surface de colloïdes argilo-humiques par l'intermédiaire de cations ([1], [2]).

La biodisponibilité du phosphore, dans les forêts alluviales rhénanes de la plaine d'Alsace établies sur des alluvions carbonatées calciques (20-30 % de  $\text{CaCO}_3$ , sols de pH 7,5-8,5) ([3], [4]), est présentée comparativement dans trois sites de la région de Rhinau, différents par leur fonctionnement hydrologique. Le premier site (forêt de l'île de Rhinau) est encore soumis à des inondations régulières, notamment estivales; le deuxième (forêt de Breitsand) est mis hors eau depuis la construction du canal d'Alsace en 1960; enfin le troisième (forêt du Dachsenkopf) est soustrait aux inondations depuis l'édification des digues externes dites de hautes eaux (1850). Notre hypothèse de travail est la suivante : les phosphates sont en principe peu disponibles dans les substrats basiques rhénans, du fait de leur précipitation sous forme de phosphate tricalcique évoluant vers des hydroxyapatites. Cependant, l'apport de phosphates solubles en pleine

saison de végétation par les eaux de crue d'une part, leur fixation sous forme échangeable sur les charges solides colloïdales d'autre part suppléeraient à l'indisponibilité potentielle des phosphates précipités dans les sites régulièrement inondés, contribuant ainsi à leur haute productivité.

1. MÉTHODE. — Le protocole correspond à celui retenu en agronomie pour le diagnostic foliaire des arbres fruitiers. Les caractéristiques pédologiques et hydrologiques des sites sont présentées dans le tableau I [4]. Quatre espèces ligneuses sont choisies : le chêne (*Quercus robur* L.), le frêne (*Fraxinus excelsior* L.), le cornouiller (*Cornus sanguinea* L.) et le lierre, forme lianescente (*Hedera helix* L.). Plusieurs dates de prélèvement des feuilles vertes sont nécessaires pour suivre l'évolution de la teneur foliaire au cours de la saison de végétation : début mai, au débourrement, feuilles jeunes; fin juin et fin août, feuilles adultes; septembre, feuilles pré-senescentes.

A chaque date de prélèvement il est procédé de la manière suivante : cinq individus par espèce et par site sont choisis en lisière (bordure de sentier ou de rivière), sur lesquels 25 feuilles de lumière, situées à l'extrémité du rameau, à une hauteur comprise entre 1,5 et 2 m et de même orientation sont cueillies. Les feuilles sont desséchées à la température du laboratoire. Les dates de prélèvement sont déterminées par l'absence de précipitations dans les 48 h qui précèdent le moment de la cueillette.

Durant la période de chute massive (septembre à décembre), les feuilles de litière sont récoltées dans des bacs à litière de 1 m<sup>2</sup> (10 bacs par site). Les feuilles sont ensuite

TABLEAU I

Caractéristiques hydrologiques et pédologiques des trois sites,  
d'après A. Schnitzler, 1988.

*Hydrological and soil profile characteristics of the three sites (from A. Schnitzler, 1988).*

Sites	1	2	3
Lieu-dit . . . . .	« Schaftheu » île de Rhinau	« Breitsand » Rhinau	« Dachsenkopf » Rhinau
Secteur . . . . .	Rhénan	Rhénan	Rhénan
Périodicité des inondations . . . .	Inondable périodiquement printemps-été	Mis hors eau par le canal d'Alsace 1960	Endigué en 1860
Amplitude annuelle de nappe . . .	1,5-2 m	0,4-0,5 m	0,3-0,4 m
Origine des sédiments . . . . .	Alpins, carbonatés 20 à 30 % de calcaire sur tout le profil		
Type de sol . . . . .	Sols alluviaux carbonatés, peu évolués, pauvres en colloïdes argilo-humiques et en M.O., riches en calcaire actif		Sols alluviaux carbonatés en voie d'évolution vers une pararendzine grise
Humus . . . . .	Hydromull eutrophe carbonaté	Mull eutrophe carbonaté	Mull moder calcique
pH . . . . .	8	8	8
Argile (%) . . . . .	22,6	21,5	A 13,5 A' 1: 5,1 A'' 1: 10,7
M.O. (%) . . . . .	5,7	5,14	7,2
Calcaire (%) . . . . .	28	26	21
Ca <sup>++</sup> (meq/100 g) . . . . .	38	13	13
Mg <sup>++</sup> (meq/100 g) . . . . .	1,46	1,16	1,17

TABLEAU II

Teneur en P (% mat. sèche) dans les feuilles vertes et dans les feuilles de litière (automne).

M, moyenne de trois valeurs; std, écart-type.

*Phosphorus content (% dry weight) in the mature and fallen leaves.**M, mean of three values; std, standard deviation.*

	Septembre 87-88-89		Automne 87-88-89		Mai 88	Mai 89	Juill. 89	Août 89
	M	(std.)	M	(std.)				
Chêne :								
Rhinau . . . . .	0,19	0,04	0,13	0,02	0,32	0,39	0,21	0,19
Breitsand . . . . .	0,17	0,01	0,08	0,02	0,31	0,46	0,18	—
Dachsenkopf . . . . .	0,13	0,03	0,05	0,02	0,30	0,46	0,15	0,15
Frêne :								
Rhinau . . . . .	0,16	0,01	0,12	0,03	0,36	0,38	0,27	0,14
Breitsand . . . . .	0,14	0,02	0,08	0,03	0,33	0,66	0,16	0,15
Dachsenkopf . . . . .	0,11	0,02	0,05	0,01	0,27	0,46	—	0,11
Cornouiller :								
Rhinau . . . . .	0,19	0,02	0,15	0,01	0,30	0,29	0,20	0,17
Breitsand . . . . .	0,14	0,01	0,11	0,03	0,30	0,33	0,20	0,16
Dachsenkopf . . . . .	0,14	0,01	0,10	0,02	0,29	0,30	0,17	0,14
Lierre :								
Rhinau . . . . .	0,23	0,06	0,10	0	0,37	0,33	0,27	0,20
Breitsand . . . . .	0,18	0,03	0,08	0,02	0,38	0,37	0,20	0,20
Dachsenkopf . . . . .	0,13	0,01	0,07	0,01	0,27	0,29	0,12	0,12

desséchées à la température du laboratoire, triées et pesées. Seules les litières sèches lors de leur récolte sont analysées. On dispose ainsi de deux à cinq échantillons par site et par espèce pour la période de chute des feuilles. Les prélèvements commencés en septembre 1987 ont été effectués jusqu'à fin 1990.

Les feuilles sont broyées (diamètre < 500 µm). L'humidité relative et les dosages sont effectués sur un échantillon de poudre séchée à 105°C pendant 24 h. Le dosage colorimétrique du phosphore total est fait après minéralisation dans un mélange V/V d'acide nitro-perchlorique par la méthode au molybdate. Les résultats sont exprimés en pour cent de matière sèche.

2. RÉSULTATS. — La période du 10 au 31 août pour les essences caducifoliées est une période de relative stabilité dans la composition minérale foliaire [5]. Les prélèvements d'août, représentatifs de la composition des feuilles adultes, montrent que les teneurs en P des espèces récoltées dans le site 1 inondable sont plus élevées que celles mesurées dans les deux autres sites (tableau II). A l'opposé le site 3, le plus anciennement soustrait aux inondations, est le plus pauvre. Par ailleurs, les teneurs des feuilles de chêne, de frêne et de cornouiller sont inférieures à celles citées par Klimo [6] dans son étude sur les forêts alluviales de Tchécoslovaquie sur sols non carbonatés, ce qui nous semble significatif d'une moindre disponibilité sur sol calcaire. Pour le cornouiller, nous disposons d'autres données portant sur un site rhénan non inondable depuis le milieu du XIX<sup>e</sup> siècle (forêts de Geisswasser et de Marckolsheim). Dans ces sites à nappe phréatique profonde, les teneurs en P sont inférieures aux nôtres (0,1 à 0,16 % MS) [7].

Nos résultats, sur l'ensemble des 3 années d'étude, montrent une tendance générale similaire : la composition foliaire varie en fonction de l'époque de l'année (tableau II, fig.); au mois de mai, après le débourrement, les teneurs en P sont évidemment très élevées, quels que soient l'espèce et le site; elles sont toujours légèrement supérieures

dans le site 1. Dès le mois de juin les teneurs baissent rapidement dans tous les sites. Les différences relevées entre juin et août sont relativement faibles dans les trois stations. En septembre, peu avant l'abscission, les teneurs foliaires sont stables ou varient faiblement dans les trois sites. L'ordre de décroissance des concentrations en P dans les sites est toujours le même, Rhinau, Breitsand, Dachsenkopf, et confirme les potentiels de fertilité de ces stations. Les feuilles de litière sont toujours nettement plus riches en P dans le site 1.

3. DISCUSSION. — Les trois sites rhénans, recouverts par une végétation typique des forêts alluviales présentent les mêmes caractéristiques géochimiques de substrats carbonatés basiques; seuls les critères de fertilité, la capacité d'échange de cation (C.E.C.) et la teneur en colloïdes changent. Le site 1 est le plus riche en colloïdes argilo-humiques et en cations basiques échangeables (tableau I). La différence réside surtout dans l'inondabilité, le site 1 étant encore soumis à des inondations périodiques. Notre étude néglige le phénomène de pluvio-lessivage des ions phosphoriques, relativement faible par rapport à d'autres ions sous certaines conditions [11]. Cependant une étude actuellement en cours a permis de vérifier les modalités du pluvio-lessivage dans la forêt alluviale rhénane du même site.

Les résultats montrent clairement que le site le plus fertile est le site 1, inondable; il bénéficie d'un apport substantiel d'éléments minéraux par les eaux de débordement du Rhin, riches en phosphates solubles ( $P-PO_4^{3-}$  jusqu'à  $180 \mu g.l^{-1}$ ) et par les eaux de la nappe souterraine affleurante ( $P-PO_4^{3-} = 30-100 \mu g.l^{-1}$ ) ([8], [9]). Le site 3 accumule des facteurs peu favorables : faible teneur en colloïdes et en cations échangeables, absence d'inondations régulières; la biodisponibilité du P y est moindre et les feuilles sans être carencées révèlent les teneurs les plus faibles en P. Dans ce site, l'ensemble des espèces stocke davantage de P par translocation de feuilles vers les bourgeons que dans les autres sites. Le site 2 possède des caractéristiques voisines du site 1 du point de vue fertilité mais l'absence d'inondations régulières explique les teneurs en P intermédiaires entre le premier et le troisième site.

Au printemps les valeurs du rapport N/P sont toutes inférieures ou proches de 10, montrant ainsi que le P est bien disponible [10]. Son origine est à déterminer : mobilisation des réserves accumulées dans les parties pérennes des plantes et/ou utilisation du P du sol rendu biodisponible par des symbiotes ([12], [13], [14]).

Les espèces choisies ne se comportent pas de manière identique dans les différents sites : chêne, frêne, cornouiller accumulent peu de réserves au moment de la chute des feuilles dans le site 1 (comportement de « gaspillage »). Dans les deux autres sites, frêne et chêne auraient tendance à économiser le P en le stockant dans les organes pérennes (translocation). Le cornouiller riche en phosphore accumule peu de P en réserve. A l'inverse le lierre, pauvre en P, économise le phosphore par stockage de réserves dans les parties pérennes de la plante dans l'ensemble des sites étudiés. En revanche, au printemps les végétaux absorbent le phosphore et l'assimilent en fonction des disponibilités respectives dans les compartiments « substrats » ou « réserves », ce qui montre l'adaptation des comportements écophysologiques. Malgré l'abondance du phosphore dans le site 1, sa rétention biogéochimique est très efficace à l'instar de celle des autres ions biogènes dans la forêt alluviale du stade terminal à l'état de maturité [9].

4. CONCLUSION. — Ces résultats préliminaires, montrent déjà :

— Le rôle des inondations qui apportent régulièrement au sol des fertilisants propices au développement des espèces en forêts alluviales, contribuant ainsi à la haute productivité

de ces forêts. Ces apports réguliers et annuels permettent de pallier les carences en phosphore, celui-ci étant progressivement précipité en milieu calcique rhénan.

– Le rôle de la texture des substrats; en effet la teneur croissante en colloïdes argilo-humiques permet l'adsorption du P soluble sous forme d'orthophosphates échangeables maintenus ainsi biodisponibles pour la végétation.

– L'importance de la spécificité du comportement des espèces étudiées; le lierre aurait tendance à économiser le phosphore dans les parties pérennes alors que frêne et chêne le relarguent par le biais de la litière dans le site 1 inondable. Le cornouiller est une espèce à la fois phosphatophile et « gaspilleuse ».

– La variabilité du comportement de translocation en fonction des stations pour une même espèce, variabilité présentant en général un caractère adaptatif.

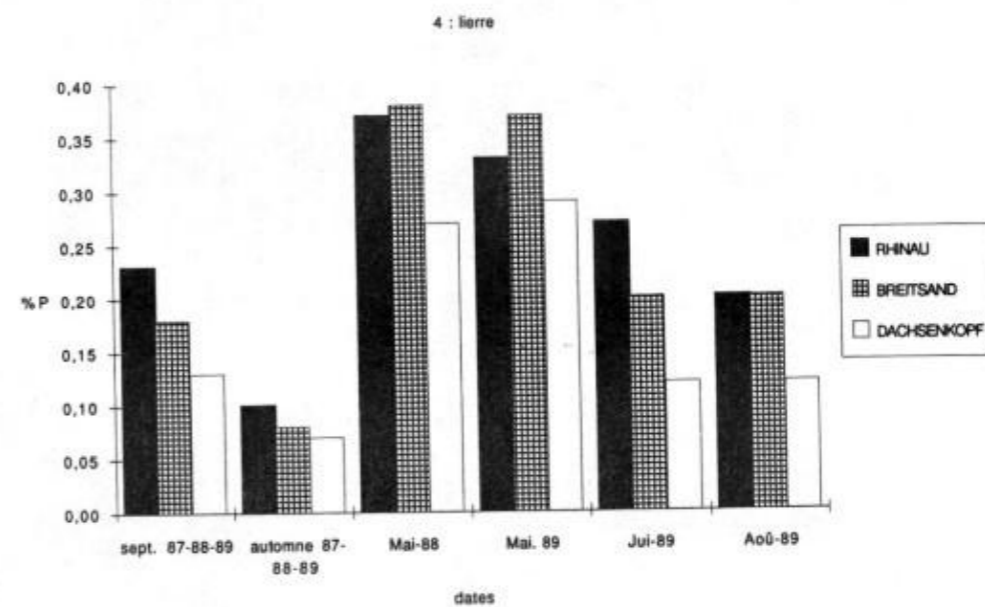
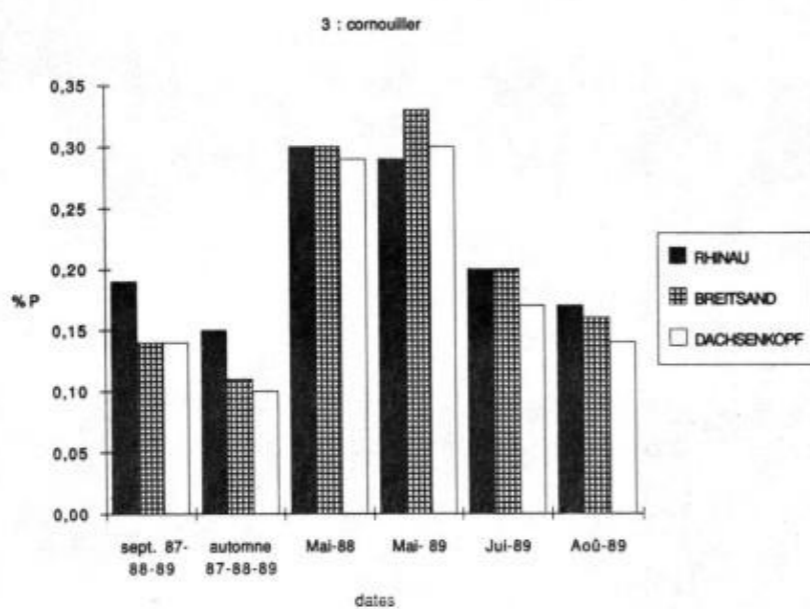
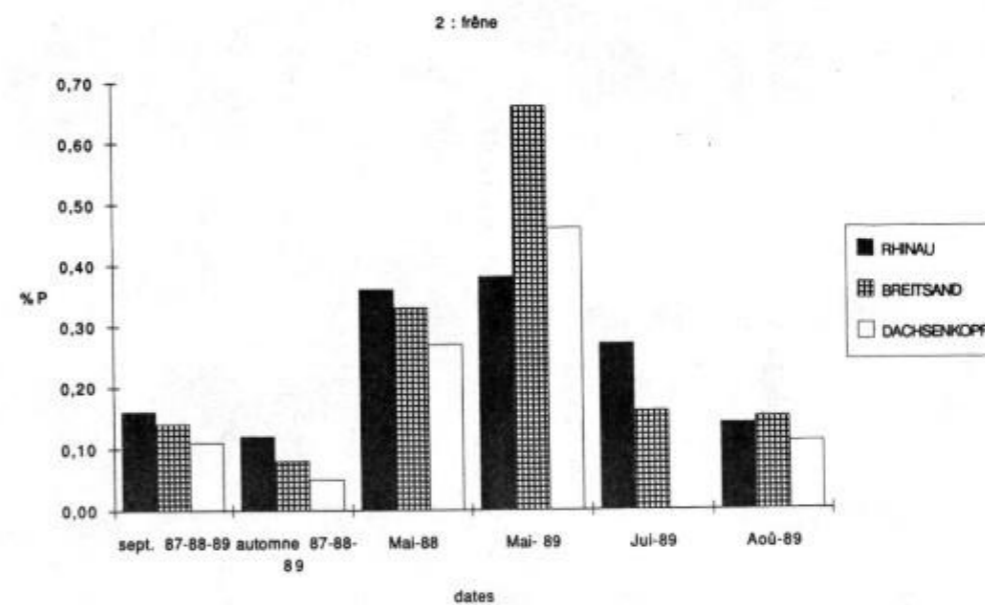
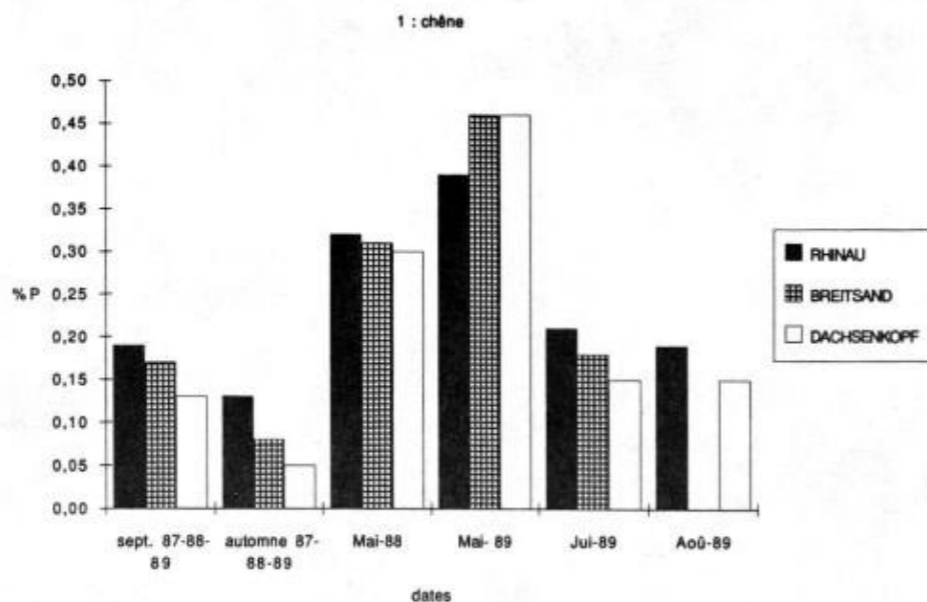
Enfin la complémentarité des cycles biogéochimiques entre espèces dominées et dominantes, déjà mise en évidence dans une étude sur le lierre [15] est ici confirmée par l'exemple du cornouiller. Les premières ont un rôle fondamental dans la restitution au sol d'éléments fertilisants nécessaires aux espèces dominantes et vice versa.

Note remise le 20 décembre 1990, acceptée après révision le 3 juillet 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] E. LE ROUX, *Sc. de l'eau*, 6, 1987, p. 97-106.
- [2] P. MANNING, *Canadian Mineralogist*, 27, 1989, p. 247-255.
- [3] R. CARBIENER, *Bulletin d'Écologie*, 14, 1983, p. 249-277.
- [4] A. SCHNITZLER, *Th. Doctorat-ès-Sciences*, U.L.P., Strasbourg, 1988, 494 p.
- [5] J. GARBAYE, *Ann. Sci. Forest.*, 4, 1972, p. 451-463.
- [6] E. KLIMO, *Floodplain forest ecosystem.*, Elsevier, 1985, p. 425-459.
- [7] H. METTAUER, Communication interne, I.N.R.A., 1975.
- [8] R. CARBIENER, M. TRÉMOLIÈRES, A. ORTSCHKEIT et J. P. KLEIN, *Deutsch-französisches Kolloquium am 6-7 octobre 1988*, H. KOBUS et L. ZILLIOX éd., Institut für Wasserbau, Heft 7, 1, 1988, p. 171-200.
- [9] J. M. SANCHEZ-PEREZ, M. TRÉMOLIÈRES et R. CARBIENER, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 312, série III, 1991, p. 395-402.
- [10] M. BONNEAU, *R.F.F.*, XL n° = sp, 1988, p. 19-27.
- [11] A. G. PRICE et R. J. WATTERS, *J. Hydrol.*, 109, 1989, p. 185-197.
- [12] M. D. JONES, D. M. DURRAL et P. B. TINKER, *New Phytol.*, 115, 1990, p. 259-267.
- [13] D. H. JENNINGS, *Elsevier Applied Sciences*, 1990, p. 223-245.
- [14] C. ESPIAU, M. CALLEJA et J. AUZAC, *Compte rendu de la réunion I.N.R.A.*, 21/22 mai 1985, Nancy.
- [15] M. TRÉMOLIÈRES, R. CARBIENER, A. EXINGER et J. C. TURLOT, *Acta Œcologica, Œcol. Plantarum*, 9, (2), 1988, p. 187-209.

Laboratoire de Botanique et de Cryptogamie,  
Faculté de Pharmacie, C.E.R.E.G.-U.R.A. n° 95, C.N.R.S., B.P. n° 24, 67401 Illkirch  
et G.U.R.E.N. (Groupe de Recherche sur l'Environnement), U.L.P.



Évolution spatio-temporelle des teneurs en P des quatre espèces étudiées. 1, chêne (*Quercus robur*); 2, frêne (*Fraxinus excelsior*); 3, cornouiller sanguin (*Cornus sanguinea*); 4, lierre (*Hedera helix*).  
 Space-time evolution of phosphorus content of four ligneous species (1, oak, *Quercus robur*; 2, ash, *Fraxinus excelsior*; 3, dogwood, *Cornus sanguinea*; 4, climbing ivy, *Hedera helix*).





## Purification et caractérisation des sous-unités présumées de l'hormone thyroïdienne d'un poisson téléostéen, l'anguille (*Anguilla anguilla*)

Jacques MARCHELIDON, Jean-Claude HUET, Christian SALMON, Jean-Claude PERNOLLET et Yves-Alain FONTAINE

**Résumé** — Nos connaissances sur les hormones thyroïdiennes (TSH) de Poissons sont encore très fragmentaires et en particulier aucune séquence peptidique n'est connue. A partir d'un extrait salin d'hypophyses d'anguille ayant une activité TSH, nous avons pu séparer, en utilisant différentes techniques de CLHP, une protéine d'un poids moléculaire apparent de 31,4 kDa composée de deux sous-unités. La séquence partielle N-terminale (24 acides aminés) de l'une des sous-unités s'est révélée identique à celle de la sous-unité  $\alpha$  de gonadotropine d'anguille ( $\alpha$ GTH II). L'autre sous-unité présente, pour la partie séquencée (22 acides aminés), 41 % d'homologie avec la  $\beta$ TSH de bœuf et 36 % avec la  $\beta$ GTH II d'anguille. La protéine purifiée présente donc des caractères biochimiques similaires à ceux des TSH de Mammifères, en particulier une sous-unité  $\alpha$  commune avec la GTH.

### Purification and characterization of the putative thyrotropic hormone subunits of a teleost fish, the eel (*Anguilla anguilla*)

**Abstract** — We have only a partial knowledge of fish thyrotropins (TSH) and no data about peptide sequence are available. Various HPLC techniques allowed us to purify a 31.4 kDa, heterodimeric protein from saline eel pituitary extracts containing TSH activity. Partial N-terminal sequence (24 amino acids) from one subunit was strictly identical to that of eel gonadotropin II (GTH II)  $\alpha$  subunit. With regard to the second subunit, 41% of the 22 amino acids identified at the N-terminus were homologous to those of bovine  $\beta$ TSH and 36% were homologous to those of eel  $\beta$ GTH II. Thus, the purified protein exhibits biochemical characteristics similar to those of mammalian TSH, in particular an  $\alpha$  subunit common with GTH.

**Abridged English Version** — Few data are available about thyrotropins (TSH) from non-mammalian vertebrates and only partial purifications have been described in a bird ([1], [2]), a reptile [3], an amphibian [4] and four teleost fish ([5], [6], [7]). This paper presents the first data on the characterization of the TSH subunits from a fish. The study was made on the eel, a species which contains, in its pituitary, quite a large quantity of TSH [5].

**MATERIALS AND METHODS.** — Acetone-dried pituitaries (400 mg) from silver stage European eels were extracted with 0.9% NaCl.

TSH activity was determined according to Fontaine and Fontaine [9]. SDS-PAGE was done following Laemmli [10] and Coomassie Blue was used as dye.

Saline extract was eluted at a flow rate of 30 ml/hr. by 0.05 M ammonium bicarbonate, pH 9, on a Sephacryl S200HR column (1.6  $\times$  97 cm). Absorbance at 280 nm and TSH activity were measured in each fraction. TSH-containing fractions were pooled and freeze-dried.

The pool was submitted to TSK DEAE-HPLC column (7.5  $\times$  75 mm); elution was run at a flow rate of 0.8 ml/min. with a gradient of ammonium acetate (0.05 to 0.5 M, pH 9) for 40 min. Absorbance at 280 nm was measured and each fraction was lyophilized.

Fractions containing TSH were made up in 0.9% NaCl, injected in a Vydac C4 RP-HPLC column (4.6  $\times$  150 mm) (flow rate 0.8 ml/min.) and eluted in 90 min. by a gradient of acetonitrile (21 to 70%) obtained by mixing 0.9% NaCl, 0.1% trifluoroacetic acid,

Note présentée par Maurice FONTAINE.

water and 0.1% trifluoroacetic acid, water, 70% acetonitrile. Absorbance at 220 nm was measured. Acetonitrile was evaporated under vacuum before lyophilization.

Each fraction was reduced by  $\beta$ -mercaptoethanol and alkylated with 4-vinylpyridine according to Henschen [11], then desalted and fractionated by elution in a gradient of acetonitrile (0 to 60% for 60 min.) on a Brownlee C8 RP-HPLC column ( $4.6 \times 30$  mm) (flow rate 0.5 ml/min.). Absorbance at 215 nm was measured and each peak manually collected.

Samples were analysed for phenylthiohydantoin amino acids in an Applied Biosystem 475 sequencer connected to a 120A chromatographic unit following the methods and with the chemicals of the manufacturer.

RESULTS AND DISCUSSION. — After gel filtration of the pituitary extract on Sephacryl, TSH activity (1.6 IU/OD) was in the protein fractions of molecular weight between 25 and 45 kDa.

After DEAE-HPLC, TSH activity was lower than 0.2 IU/OD in the unabsorbed fraction. It rose to 12 IU/OD in the fraction eluted for 0.165 M ammonium acetate (fraction 26), fell to 5 IU/OD in fraction 28 and less than 2 IU/OD in fraction 36 (0.25 M acetate). No TSH activity appeared after 0.3 M ammonium acetate. SDS-PAGE (*Fig. 1*) of fraction 27 gave three bands (14.4, 17 and 20 kDa).

RP-HPLC on C4 of the biologically active DEAE pool gave four peaks (*Fig. 2*) eluted for 26, 29, 38 and 48% acetonitrile (peaks 1 to 4). These peaks were sequenced after reduction, alkylation and RP-HPLC on C8. Only peaks 1 and 4 gave N-terminal sequences. Peak 4, eluted for 45% acetonitrile on C8, gave two partial sequences (23 amino acids) corresponding to those described for the two forms of the Japanese eel growth hormone (GHI and GHII) [12]. Peak 1 gave two peaks "A and B" eluted for 26 and 30% acetonitrile on C8. N-terminal sequence (24 amino acids) of A was identical to that of the eel  $\alpha$  GTH II [13] and the partial sequence (22 amino acids) of B presented 41% homology with that of bovine  $\beta$  TSH [14] (Table) and only 36% with that of eel  $\beta$  GTH II [15].

These results suggest that the protein peak 1 is constituted by the eel TSH. Moreover, in the SDS-PAGE, considering that the 20 kDa band corresponds to the GH [12], the sum of the molecular weights of the two other bands is 31.4 kDa, a value close to that founded by an ultracentrifugation method for the eel TSH [5].

---

INTRODUCTION. — On dispose de peu de données sur les hormones thyroïdiques (TSH) de Vertébrés non mammaliens, la purification au moins partielle de cette hormone ayant été effectuée seulement à partir d'hypophyses d'un oiseau ([1], [2]), d'un reptile [3], d'un amphibien [4] et de quatre poissons téléostéens ([5], [6], [7]). Le comportement de ces hormones au cours des dernières étapes de la purification semble indiquer que les TSH de ces espèces, comme celles de Mammifères, sont des glycoprotéines d'un poids moléculaire de 30-35 kDa. Les résultats d'électrophorèse en conditions dénaturantes ont conduit Swanson et coll. [7] à suggérer que la TSH de saumon est composée de deux sous-unités comme les hormones mammaliennes.

Nous apportons ici les premières données sur la caractérisation des sous-unités de la TSH d'un poisson téléostéen. Ce travail a été effectué sur l'anguille, espèce dont l'hypophyse contient une activité TSH importante ([5], [8]).

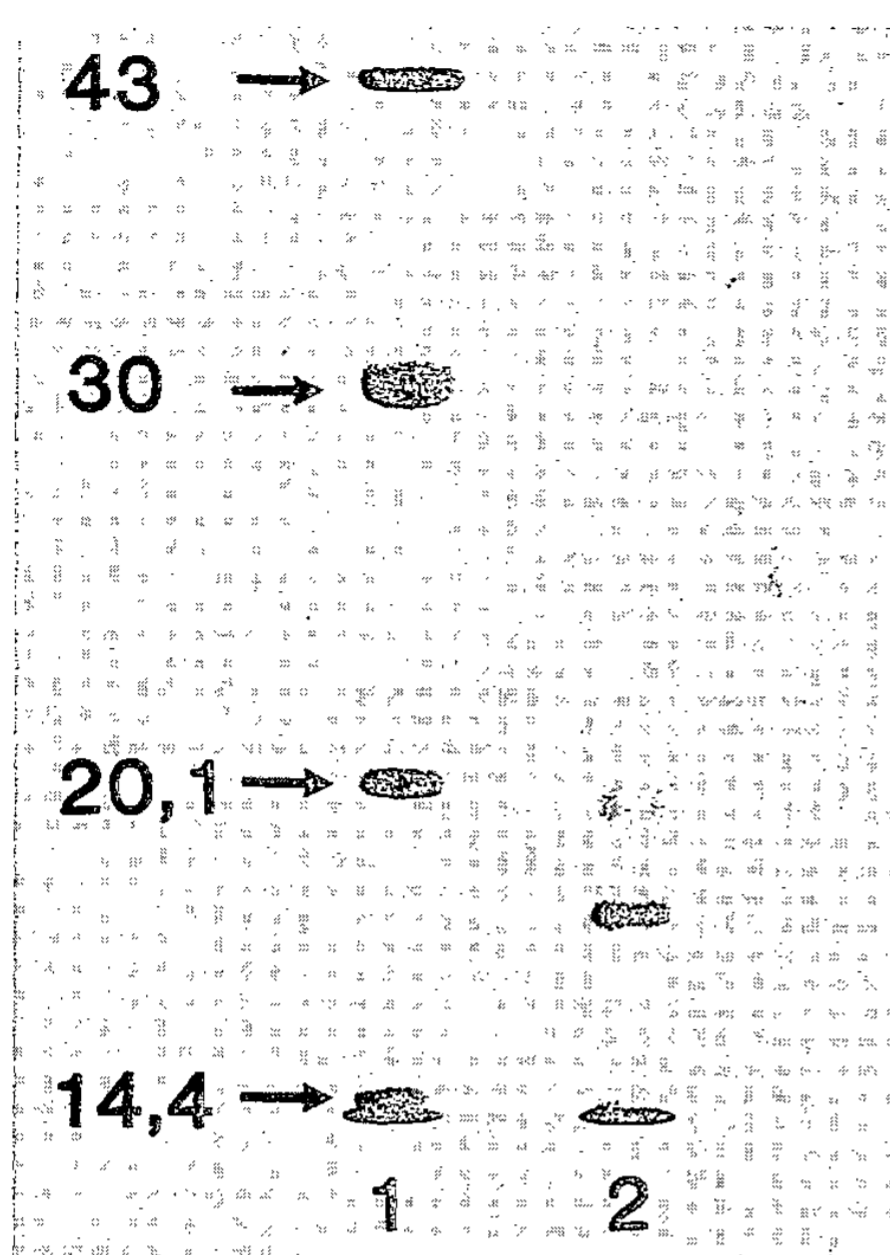


Fig. 1

Fig. 1. — Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante. Piste 1 : étalons de poids moléculaire en kDa (Pharmacia, réf. 17-0446-01). Piste 2 : 15  $\mu$ l de la fraction 27 de DEAE-CLHP reprise dans 120  $\mu$ l de tampon d'échantillon de Laemmli.

Fig. 1. — SDS PAGE. Lane 1: molecular weight standards in kDa (Pharmacia, ref. 17-0446-01). Lane 2: 15  $\mu$ l of fraction 27 from DEAE-HPLC diluted in 120  $\mu$ l of Laemmli sample buffer.

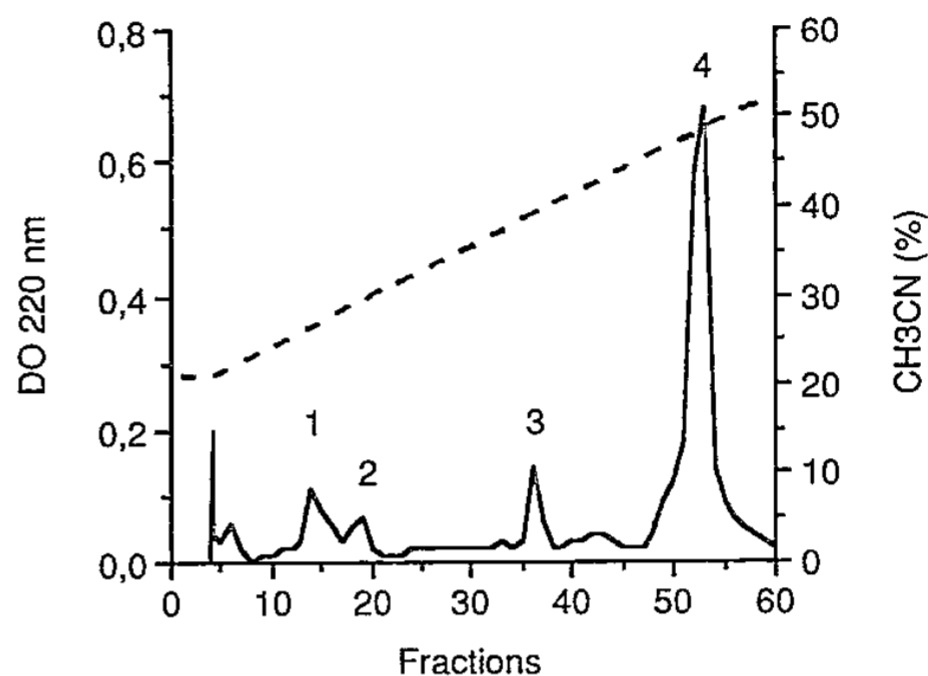


Fig. 2

Fig. 2. — RP-CLHP sur colonne Vydac C4 du pool des fractions 24 à 27 obtenues par DEAE-CLHP. DO 220 nm: —; [CH<sub>3</sub>CN]: ----.

Fig. 2. — RP-HPLC on Vydac C4 column of the pool of the 24 to 27 pooled fractions from DEAE-HPLC. OD 220 nm: —; [CH<sub>3</sub>CN]: ----.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — Les hypophyses, prélevées après décapitation, sur des anguilles argentées ont été plongées immédiatement dans l'acétone froide (0°C). L'acétone est renouvelé deux fois à 24 h d'intervalle et les hypophyses sont desséchées sous vide.

**Extraction.** — Les hypophyses sèches (400 mg) sont mises dans 2 ml de NaCl 0,9 % à 0°C et broyées à l'aide d'un agitateur en pratiquant des congélations et décongélations successives. Après rinçage par 1 ml de NaCl 0,9 %, la suspension est centrifugée 10 mn à 3000 g à 4°C. Le surnageant est récupéré et le culot resuspendu dans 2 ml de NaCl 0,9 %. L'extraction est renouvelée trois fois et le volume final de surnageant est ajusté à 10 ml avec NaCl 0,9 %.

**Activité biologique.** — L'activité biologique est déterminée en mesurant l'augmentation de fixation d'iode radioactif par la thyroïde de truites juvéniles à jeun selon la méthode décrite par Fontaine et Fontaine [9].

**Électrophorèse.** — Elle est réalisée sur gel de polyacrylamide 10 % selon la technique de Laemmli [10]. La coloration est faite au bleu de Coomassie.

**Fractionnement.** — L'extrait salin est déposé sur une colonne (1,6  $\times$  97 cm) de Séphacryl S200HR (Pharmacia) équilibrée avec une solution de bicarbonate d'ammonium

TABLEAU

Comparaison de la séquence N-terminale de la composante B issue du pic C4 n° 1 (a) avec celles de la  $\beta$  TSH de bœuf (b) [14] et de la  $\beta$  GTH II d'anguille (c) [15]. Les tirets indiquent les acides aminés identiques à ceux de la composante B. Les cystéines sont alignées et encadrées.

Comparison of the N-terminal sequence from B component of the C4-peak No. 1 (a) with those of bovine  $\beta$  TSH (b) (14) and eel  $\beta$  GTH II (c) (15). Hyphens indicate amino acids identical to those of B component. Cysteins are aligned and boxed.

	I	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span>	S	P	V	D	Y	T	L	Y	V	E	K	P	E	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span>	D	F	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span>	V	A	I	(a)			
	F	-	I	-	T	E	-	M	M	H	-	-	R	K	-	-	A	Y	-	L	T	-	(b)			
S	L	L	L	P	-	E	-	I	N	E	-	I	S	-	-	-	D	G	-	P	K	-	L	V	F	(c)

0,05 M pH 9. L'élution est effectuée à l'aide du même tampon à un débit de 30 ml/h. Les fractions (4 ml) sont collectées, leur densité optique (D.O.) est mesurée à 280 nm et celles ayant une activité TSH sont rassemblées et lyophilisées.

Ce pool est dissout dans 350  $\mu$ l d'acétate d'ammonium 0,05 M pH9 et injecté sur une colonne CLHP (TSK DEAE-5PW; 7,5  $\times$  75 mm) maintenue à 4°C. L'élution est effectuée à un débit de 0,8 ml/mn par un gradient 0,05 à 0,5 M d'acétate d'ammonium en 40 mn. La D.O. à 280 nm est mesurée en continu en sortie de colonne et des fractions de 0,8 ml sont collectées et lyophilisées.

Les fractions contenant l'activité TSH sont reprises dans 300  $\mu$ l de NaCl 0,9 % et injectées sur une colonne CLHP phase inverse (RP-CLHP) (Vydac C4; 4,6  $\times$  150 mm). L'élution est effectuée à un débit de 0,8 ml/mn par un gradient d'acétonitrile (21-70 % en 90 mn) obtenu en mélangeant une phase mobile A (NaCl 0,9 %/acide trifluoroacétique 0,1 % dans H<sub>2</sub>O Lichrosolv Merck) et une phase mobile B (acétonitrile 70 %/acide trifluoroacétique 0,1 % dans H<sub>2</sub>O Lichrosolv Merck). La D.O. à 220 nm est mesurée en continu et des fractions de 0,8 ml sont collectées. L'acétonitrile est évaporé sous vide et les fractions sont lyophilisées.

Chaque fraction est réduite par le  $\beta$  mercaptoéthanol et alkylée par la 4-vinylpyridine selon la technique décrite par Henschen [11]. Le dessalage et le fractionnement de chaque échantillon sont réalisés par chromatographie en phase inverse sur une cartouche Aquapore C8-30 nm de 4,6  $\times$  30 mm (Brownlee Labs) avec un appareil Spectra Physics SP8800. L'élution est effectuée par un gradient d'acétonitrile (0-60 %) en 60 mn : solvant A (acide trifluoroacétique 0,1 % dans l'eau Milli-Q), solvant B [acétonitrile, acide trifluoroacétique (60, 0,09 %) dans l'eau Milli-Q] à un débit de 0,5 ml/mn. La D.O. à 215 nm est mesurée en continu et permet la collecte manuelle de chaque pic chromatographique.

*Séquençage peptidique.* — Les échantillons (30-120  $\mu$ l) sont déposés sur le disque en fibres de verre imprégné de polybrène d'un séquenceur Applied Biosystem 475 couplé au module chromatographique 120A pour l'analyse des phénylthiohydantoïnes acides aminés, avec les méthodes et les produits chimiques du fabricant.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Après filtration sur Séphacryl S200 HR de l'extrait salin d'hypophyses, l'activité TSH se trouve dans les fractions correspondant à des protéines d'un poids moléculaire de 25 à 45 kDa. L'activité biologique spécifique de ce pool lyophilisé est de 1,6 UI/unité de D.O.

Après une chromatographie sur TSK-DEAE de ce pool, l'activité TSH est inférieure à 0,2 UI/D.O. dans la fraction non adsorbée. Elle atteint 12 UI/D.O. dans la fraction éluee

pour 0,165 M d'acétate d'ammonium (fraction 26), 5 UI/D.O. dans la fraction 28 et décroît jusqu'à une valeur inférieure à 2 UI/D.O. pour une molarité de 0,25 M (fraction 36); aucune activité n'est décelable pour des molarités supérieures à 0,3 M. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (*fig. 1*) effectuée pour le pic d'activité TSH (fraction 27) donne trois bandes correspondant à des poids moléculaires de 14,4, 17 et 20 kDa.

La chromatographie en phase inverse sur Vydac-C4 du pool biologiquement actif obtenu par DEAE-CLHP donne, après la fraction non retenue, quatre pics majeurs (*fig. 2*) élués par 26, 29, 38 et 48 % d'acétonitrile (pics 1 à 4 respectivement).

Après réduction et alkylation, suivies d'une seconde RP-CLHP sur Aquapore C8 de chacun d'eux et du séquençage peptidique des pics obtenus, seuls les pics 1 et 4 nous ont fourni des séquences N-terminales.

Le pic 4 donne, sur Aquapore C8, un pic élué à 45 % d'acétonitrile. La séquence partielle montre la présence de deux chaînes peptidiques apparentées, l'une commençant au résidu 4 de l'autre; ces deux séquences partielles (23 acides aminés) sont identiques à celles décrites pour les deux formes de l'hormone de croissance (GHI et GHII) de l'anguille japonaise (*Anguilla japonica*) [12].

Le pic 1 est résolu sur Aquapore C8 en deux pics A et B, élués respectivement à 26 et 30 % d'acétonitrile, donnant des séquences partielles différentes. Celle de A, sur 24 acides aminés, est strictement identique à la séquence des 24 acides aminés N-terminaux de la sous unité  $\alpha$  de GTH II d'anguille [13]. Après alignement des cystéines, la séquence N-terminale (22 acides aminés) du pic B présente 41 % d'homologie avec celle de la  $\beta$  TSH de bœuf [14] (tableau) et seulement 36 % avec celle de la  $\beta$  GTH II d'anguille [15]. La composante A est constituée par la sous-unité  $\alpha$  TSH et la B vraisemblablement par la sous-unité  $\beta$  TSH.

L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine éluee dans le pic 1 de la RP-CLHP sur Vydac C4 est la TSH d'anguille. De plus, l'électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide, réalisée au pic d'activité, donne trois bandes. Celle à 20 kDa correspond sans doute à la GH [12]. La somme des poids moléculaires des deux autres bandes est de 31,4 kDa, valeur très proche de celle déterminée par ultracentrifugation pour la TSH d'anguille (31 kDa) [5].

Nous nous attachons actuellement à déterminer la séquence totale de la sous-unité  $\beta$  TSH par les techniques de biologie moléculaire.

Les auteurs remercient M<sup>me</sup> Le Belle pour les dosages biologiques, M<sup>me</sup> Mansion et M. Ouali pour les déterminations de séquences peptidiques ainsi que M. Caillault, ancien directeur du Laboratoire de Contrôle du Centre de Transfusion sanguine de Montpellier, pour les hypophysés d'anguille.

Note remise le 1<sup>er</sup> juillet 1991, acceptée le 22 juillet 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. G. SCANES et B. K. FOLLET, *Brit. Poult. Sci.*, 13, 1972, p. 603-610.
- [2] H. PAPKOFF, B. LICHT, A. BONNA-GALLO, D. S. MACKENZIE, W. OELOFSEN et M. M. J. OOSTHUIZEN, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 48, 1982, p. 181-185.
- [3] D. S. MACKENZIE, P. LICHT et H. PAPKOFF, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 45, 1981, p. 39-48.
- [4] D. S. MACKENZIE, P. LICHT et H. PAPKOFF, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 36, 1978, p. 566-574.
- [5] Y.-A. FONTAINE et P. G. CONDLIFFE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45, 1963, p. 681-693.
- [6] T. B. NG, D. R. IDLER et J. G. EALES, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 48, 1982, p. 372-389.
- [7] P. SWANSON, W. W. DICKHOFF et A. GORBMAN, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 65, 1987, p. 269-287.
- [8] Y.-A. FONTAINE, *Acta Endocrinol.*, 60, (suppl. 136), 1969, p. 1-154.

- [9] M. FONTAINE et Y.-A. FONTAINE, *J. Physiol.*, Paris, 48, 1956, p. 881-892.
- [10] U. K. LAEMMLI, *Nature*, 227, 1970, p. 680.
- [11] A. HENSCHEN, In : B. WITTMAN-LIEBOLD, J. SALNIKOW et V. A. ERDMANN éd., *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis*, 1986, p. 244-255, Springer-Verlag, Berlin.
- [12] M. KISHIDA, T. HIRANO, J. KUBOTA, S. HASEGAWA, H. KAWAUCHI et K. YAMAGUSHI, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 65, 1987, p. 478-488.
- [13] B. QUERAT, M. JUTISZ, Y.-A. FONTAINE et R. COUNIS, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 71, 1990, p. 253-259.
- [14] J. G. PIERCE et T. F. PARSON, *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 1981, p. 465-495.
- [15] B. QUERAT, M. MOUMNI, M. JUTISZ, Y.-A. FONTAINE et R. COUNIS, *J. Mol. Endocrinol.*, 4, 1990, p. 257-264.

---

J. M., C. S. et Y.-A. F. : *Laboratoire de Physiologie générale et comparée  
du Muséum national d'Histoire naturelle,  
U.R.A.-C.N.R.S. n° 90, 7, rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05;*  
J.-C. H. et J. C. P. : *Laboratoire d'Étude des Protéines,  
Physiologie et Biochimie végétales, I.N.R.A., 78026 Versailles Cedex.*

## Isolement, identification et activité biologique de phospholipides isolés du mycélium de *Phytophthora capsici*

Véronique PIVOT, Maud BRUNETEAU, Pierre MAS, Paul-Michel MOLOT  
et Georges MICHEL

**Résumé** — Des phospholipides isolés du mycélium de *P. capsici* induisent une protection des cotylédons de piment vis-à-vis de ce même parasite et chez le blé une résistance au parasite racinaire, *Gaeumannomyces graminis*. La structure du composé majoritaire est démontrée par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire. Il s'agit de la dihexadécanoyl phosphatidylcholine, présente en mélange avec la ditétradécanoyl et dioctadécanoyl phosphatidylcholine.

### Isolation, identification and biological activity of phospholipids from *Phytophthora capsici* mycelium

**Abstract** — Phospholipids from *Phytophthora capsici* mycelium induce a resistance in pepper cotyledons to infection by *P. capsici* and in wheat to infection by *Gaeumannomyces graminis*. The major compound was identified as dihexadecanoyl phosphatidylcholine by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. It was accompanied by a mixture of ditetradecanoyl and dioctadecanoyl phosphatidylcholine.

**Abridged English Version** — Various lipids from parasitic fungi have been found to be elicitors of plant defence reactions ([1]-[8]).

From *Phytophthora capsici* mycelium a phospholipid was isolated, which induced a protection in pepper against the pathogen *P. capsici* and a resistance of wheat to infection by *Gaeumannomyces graminis*.

Purification and structural determination of this elicitor of resistance are described. The strain 107 of *P. capsici* was grown on unshaken synthetic medium for three weeks [9]; mycelium was separated from medium by centrifugation. The mycelium was homogenized in 500 ml of 100 mM potassium phosphate pH 7.2 at 0°C for 10 min. with an Ultra-Turrax grinder. After filtration, the homogenized mycelium (mycelial cell walls) was washed with 1,500 ml of the same buffer and twice with deionized water. The mycelial cell walls were lyophilized, treated with chloroform-methanol (2/1 v/v) and the lipid extract was fractionated on a silicic acid Bio-Sil HA column using chloroform, chloroform with increasing concentrations of methanol (5 to 50%) and methanol as solvents. Eluates were analyzed by thin-layer chromatography on HPTLC plates with the solvent of Heape *et al.* [10]. The detection of compounds was carried out by spraying the plates with various reagents: 10% sulphuric acid vanillin, Dittmer and Lester reagent modified by Vaskovsky and Kostetsky [11], Dragendorff reagent modified by Wagner [12].

Phosphorus was measured by the method of Lowry *et al.* [13]. Fatty acid methylesters were analyzed on an Intersmat 120 FL gas chromatograph using a capillary SP 2100 column (0.25 mm × 25 m) with temperature programming from 140 to 260°C. The same device, which was fitted with a capillary SP 2380 column (0.25 mm × 20 m) at 240°C was used for the analysis of the acetylglycerol derivative.

Fast atom bombardment-mass spectrometry (FAB-MS) of the phospholipid was carried out using a VG Analytical spectrometer (model ZAB 2-SEQ).

Note présentée par André CAUDERON.



Nuclear magnetic resonance spectrometry ( $^1\text{H}$  NMR) of the compound was carried out using a "Brucker A.M. 300" spectrometer.

The fractionation of the total lipid extract from mycelial cell walls by chromatography on silicic acid Bio-Sil HA gave a phospholipid fraction which protected pepper and wheat against pathogen.

Susceptibility of pepper cotyledons to *P. capsici* was 45% for 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 21% for 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of phospholipid fraction solution (Fig. 1 a).

The treatment of wheat kernels with elicitor had the following effect on plants: a 27% loss of dry weight with non-infected plants and a 29% increase of dry weight with plants infected by *G. graminis* (Fig. 1 b).

The fraction eluted with methanol was analyzed by thin-layer chromatography in the solvent of Heape *et al.* [10], it gave a spot stained with specific reagents for phospholipids and tertiary amine which comigrated with standard phosphatidylcholine. This fraction contains phosphorus, glycerol, choline and fatty acids identified as tetradecanoic acid (C 14:0), hexadecanoic acid (C 16:0) and octadecanoic acid (C 18:0).

Enzymatic hydrolysis with phospholipase C yield a sn-1,2-diacylglycerol and phosphorylcholine (Fig. 2).

Fast atom bombardment-mass spectrometry (Fig. 3) and nuclear magnetic resonance spectrometry permitted identification of the active fungal lipid as dihexadecanoyl phosphatidylcholine [14] with minor amounts of ditetradecanoyl and dioctadecanoyl phosphatidylcholine (Fig. 2 and Table).

---

INTRODUCTION. — De nombreux travaux ont démontré la présence dans le mycélium de champignons phytopathogènes de lipides capables d'induire un état de résistance chez leur plante hôte respective ([1]-[8]).

A partir du mycélium de *Phytophthora capsici*, mildiou du piment, nous avons isolé un phospholipide qui, d'une part, protège le piment vis-à-vis de ce même parasite et d'autre part, induit chez le blé une résistance à *Gaeumannomyces graminis*, agent du piétin échaudage.

Nous avons purifié et déterminé la structure de cet inducteur de résistance.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Conditions de culture du champignon et préparation des parois mycéliennes. — La souche 107 de *P. capsici* est mise en culture stationnaire sur milieu liquide synthétique contenant 50 g/l de saccharose [9] durant 3 semaines. Le filtrat est séparé du mycélium; 100 g de mycélium congelé sont broyés pendant 10 mn à l'Ultra-Turrax à 0°C dans 500 ml de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,2. Après filtration sous vide, le résidu est lavé pendant 15 mn dans 1 500 ml du même tampon, puis par le même volume de tampon 0,5 M, puis deux fois par l'eau distillée.

Les parois brutes ainsi obtenues sont lyophilisées.

Extraction et fractionnement des lipides totaux. — L'extraction est réalisée par broyage à l'Ultra-Turrax à 20°C pendant 10 mn dans le mélange chloroforme-méthanol (2/1 v/v). Les lipides sont chromatographiés sur colonne d'acide silicique Bio-Sil HA 325 mesh. Les solvants d'éluion successifs sont le chloroforme, des mélanges chloroforme-méthanol contenant 5 à 50 % de méthanol et le méthanol.

Les éluats sont analysés par chromatographie unidimensionnelle sur couche mince à haute performance de gel de silice 60 dans le solvant de Heape et coll. [10]. Les plaques

sont révélées par la vanilline sulfurique (réactif des lipides), par le réactif de Dittmer et Lester modifié par Vaskovsky et Kostetsky [11] spécifique des phospholipides et par le réactif de Draggendorf modifié par Wagner [12] spécifique des amines tertiaires.

*Méthodes analytiques.* — Le phosphore est dosé par colorimétrie [13]. Les acides gras sont analysés sous forme d'esters méthyliques après méthanolyse des phospholipides, par chromatographie gazeuse (Intesmat 120 FL à ionisation de flamme) sur une colonne capillaire SP 2100 de 0,25 mm de diamètre et 25 m de longueur à 140-260°C.

L'analyse du glycérol est réalisée par chromatographie gazeuse du dérivé acétylé sur colonne capillaire SP 2380 de 0,25 mm de diamètre et de 20 m de longueur à 240°C. L'analyse de la choline est effectuée par chromatographie sur papier dans le solvant phénol-eau (100/38 v/v).

Les spectres de masse ont été réalisés avec un double spectromètre de masse « VG Analytical », modèle ZAB2-SEQ.

L'analyse par résonance magnétique nucléaire du proton a été effectuée dans un spectromètre « Bruker AM.300 ».

*Hydrolyse enzymatique (phospholipase C).* — Le phospholipide (2,5 mg) dans 0,3 ml de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,2 et 2 mM en CaCl<sub>2</sub> est incubé pendant 3 h à température ambiante en présence de 300 µg de protéine enzymatique. Les produits de la réaction liposolubles, sont analysés par chromatographie sur couche mince de gel de silice, les produits de la réaction hydrosolubles, par chromatographie sur papier.

*Contrôles biologiques.* — Ils sont effectués soit sur piment (cultivar Bastidon) soit sur blé (cultivar Lutin).

Sur la face inférieure de cotylédons de piment en survie sur l'eau, on dépose 20 µl de la préparation élicitrice; après résorption de la goutte (environ 24 h), la contamination de contrôle est réalisée au même site avec 10 µl d'une suspension de zoospores de *P. capsici* (80 000 zoospores/ml). Au bout de 5 jours d'incubation à 22°C sous 16 h de lumière, les symptômes sont notés de 0 à 3 et exprimés après calcul en indice de sensibilité. Chaque traitement comporte 20 cotylédons.

Cinquante caryopses de blé sont mis à imbiber pendant 48 h à 20°C dans 25 ml d'une préparation élicitrice à 100 µg/ml de phospholipides. Après émission des premières racines, celles-ci sont contaminées par dépôt d'un implant calibré ( $\varnothing=2$  mm) d'une culture mycélienne de *G. graminis*. Les plantules poursuivent leur développement dans du terreau. Après 10 semaines de culture sous serre, on prélève toutes les parties aériennes dont on détermine la masse sèche.

**RÉSULTATS.** — Le fractionnement des lipides totaux extraits du mycélium de *P. capsici* permet l'isolement de phospholipides éliciteurs actifs à la fois sur piment et sur blé (fig. 1).

Sur piment (fig. 1 a), l'indice de sensibilité des cotylédons est de 45 % pour 10 µg/ml et de 21 % pour 250 µg/ml.

Sur blé (fig. 1 b), en présence ou en absence de contamination, les plantules élicitées ont des poids comparables : on observe un effet dépressif par rapport aux plantules saines non élicitées, mais un effet nettement positif par rapport aux plantules contaminées non élicitées.

Les phospholipides, fraction éluée par le méthanol, représentent 0,4 % des lipides totaux. Cette fraction révélable par le réactif de Vaskovsky et Kostetsky [11] ne réagit pas à la ninhydrine; par contre elle a une réaction positive au réactif de Wagner [12]. En

chromatographie sur couche mince de gel de silice, cette fraction phospholipidique a le même  $R_F$  que la dimyristoyl phosphatidylcholine témoin. Elle contient du phosphore, du glycérol, de la choline et des acides gras identifiés à l'acide tétradécanoïque (C 14:0), hexadécanoïque (C 16:0) et octadécanoïque (C 18:0).

Une hydrolyse enzymatique par la phospholipase C de la phosphatidylcholine témoin et du lipide fongique conduit aux mêmes composés : le sn-1,2-diacylglycérol et la phosphorylcholine (fig. 2).

Une analyse par résonance magnétique nucléaire du proton confirme la présence d'une amine tertiaire dans la molécule fongique dont le spectre présente les mêmes déplacements chimiques des protons que la phosphatidylcholine témoin.

Une analyse par spectrométrie de masse est effectuée en fast atom bombardment-mass spectrometry (FAB-MS). Le spectre obtenu représenté sur la figure 3, présente les pics

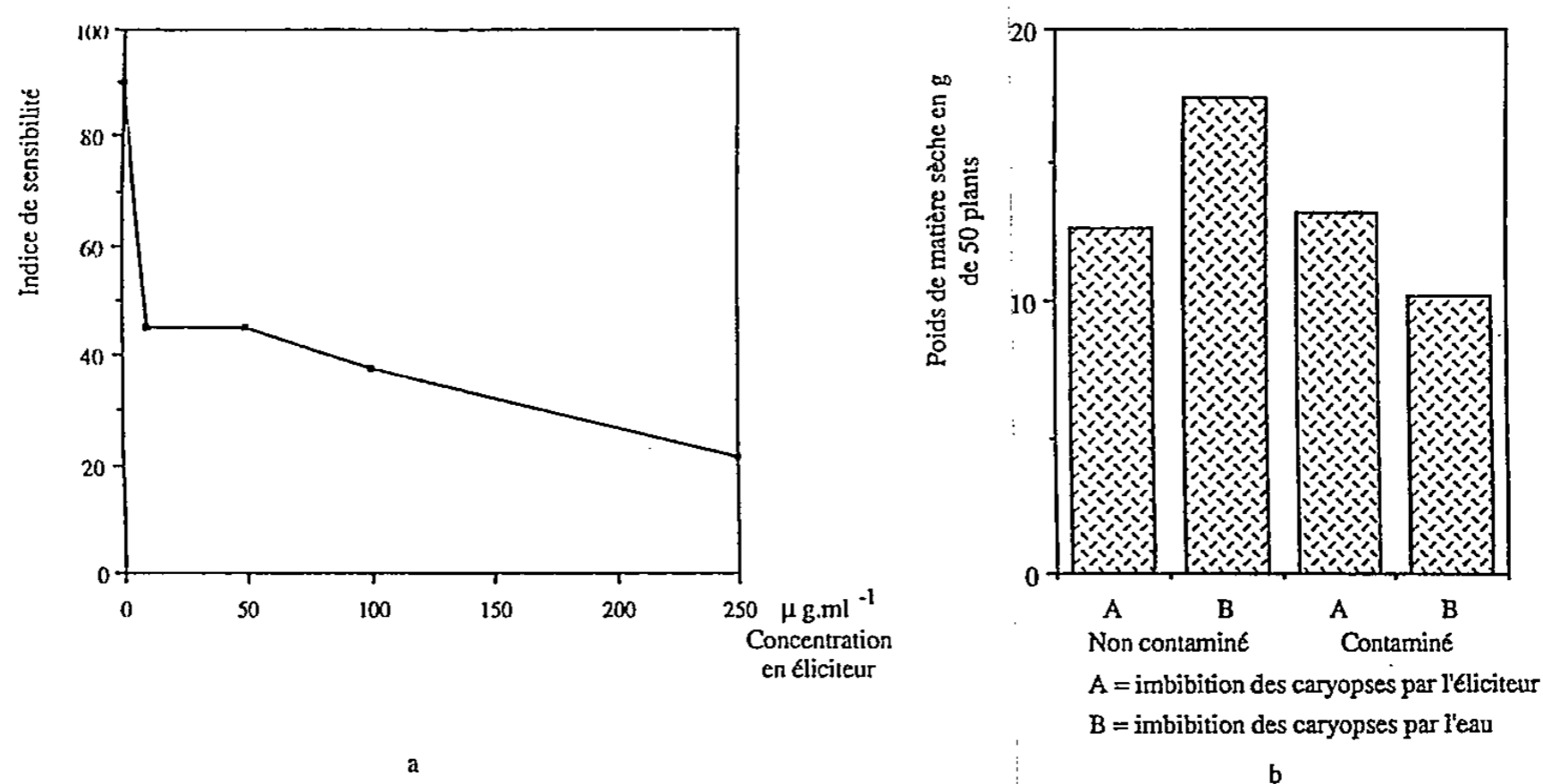


Fig. 1. — Activité biologique des phospholipides isolés de *Phytophthora capsici*, 107. (a) Sensibilité des cotylédons de piment à *Phytophthora capsici*, 107. Le volume de la solution élicitrice utilisée est de 25  $\mu\text{l}$ /cotylédon pour chaque concentration. (b) Sensibilité du blé, cultivar Lutin, à *Gaeumannomyces graminis*. Cinquante caryopses sont traités par 2,5 ml d'une solution élicitrice contenant 100  $\mu\text{g}$  de phospholipides. La durée de l'imbibition est de 48 h à 20°C.

Fig. 1. — Biological activity of phospholipids from *Phytophthora capsici*, 107. (a) Susceptibility to *Phytophthora capsici* of pepper cotyledons. The volume of elicitor solution was 25  $\mu\text{l}$ /cotyledon for each concentration. (b) Susceptibility to *Gaeumannomyces graminis* of wheat, cultivar Lutin. Fifty kernels were treated with 2.5 ml of elicitor solution containing 100  $\mu\text{g}$  of phospholipids. The time of soaking was 48 hrs. at 20°C.

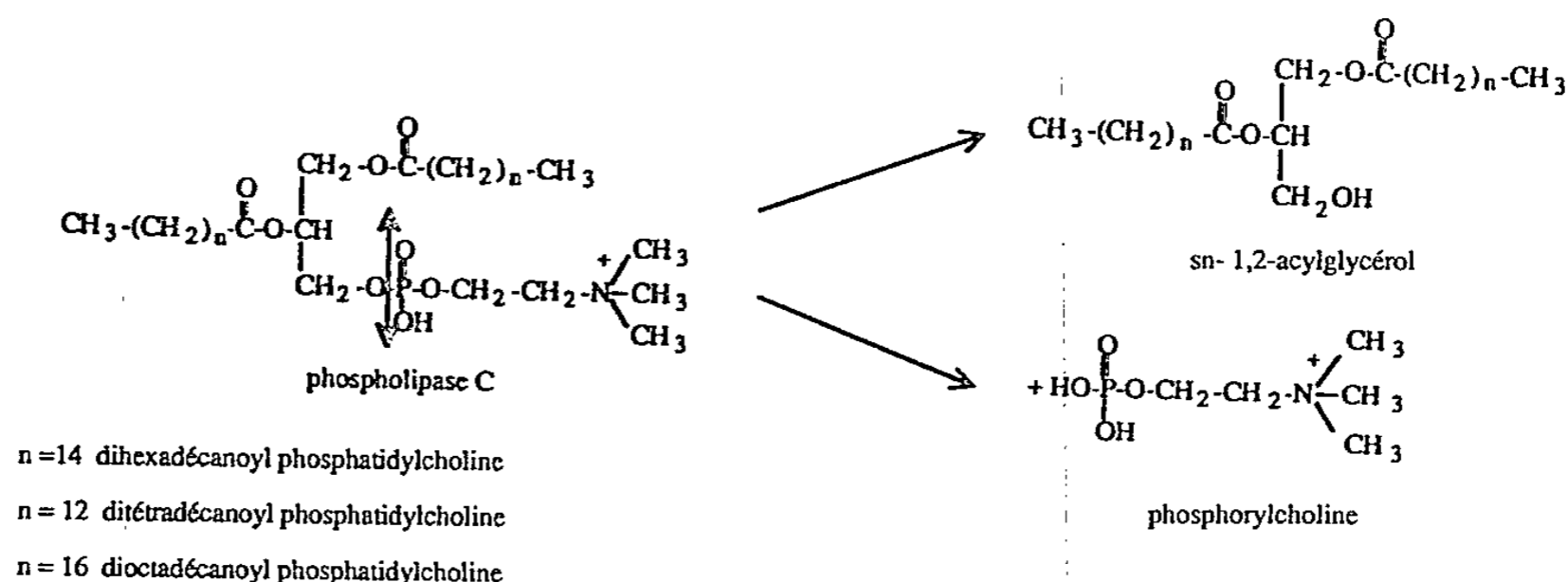


Fig. 2. — Hydrolyse de la phosphatidylcholine par la phospholipase C.

Fig. 2. — Hydrolysis of phosphatidylcholine with phospholipase C.

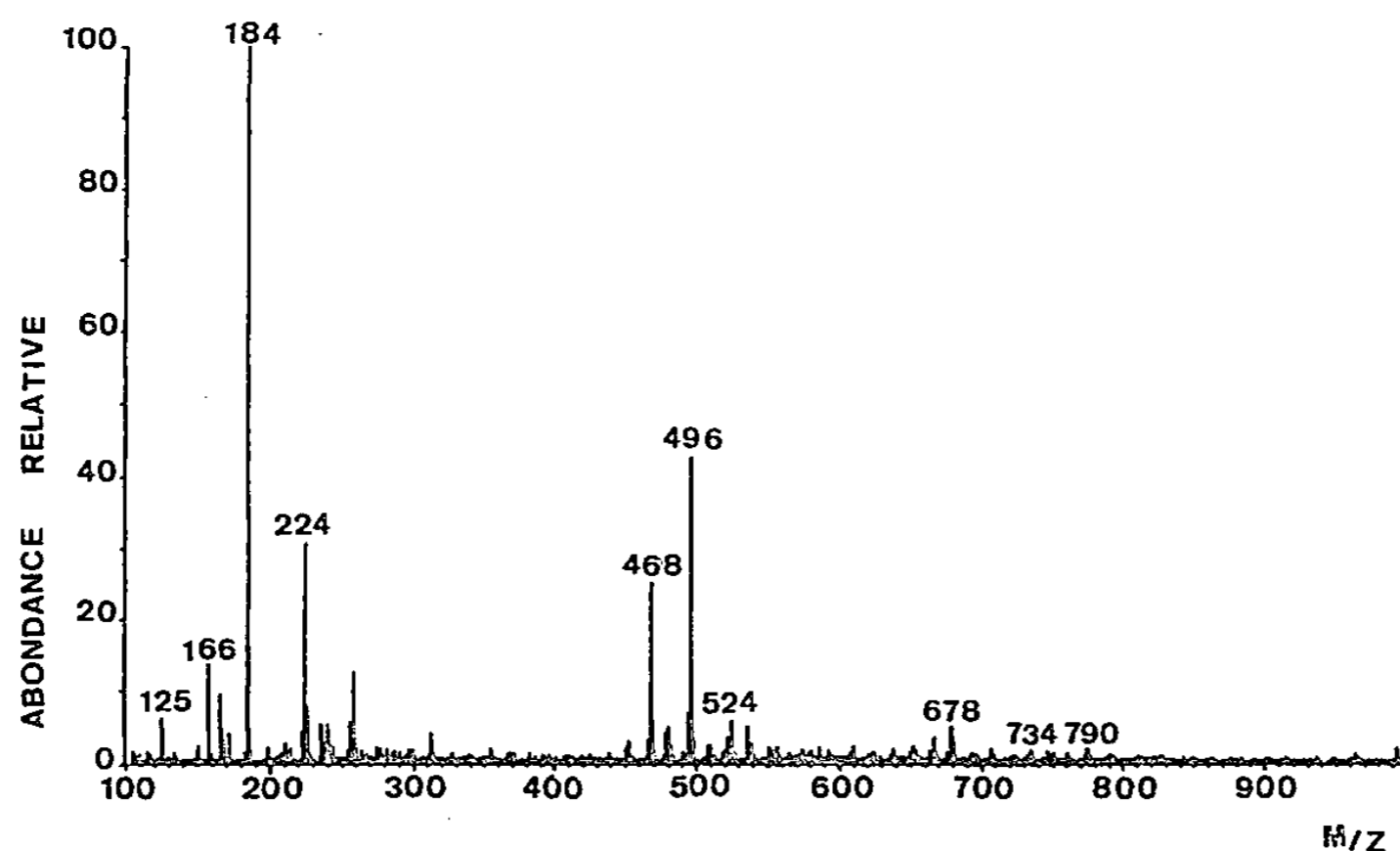


Fig. 3. — Spectre de masse en FAB positif des phospholipides isolés de *Phytophthora capsici*, souche 107.

Fig. 3. — Positive ion FAB spectrum of phospholipids from *Phytophthora capsici*, strain 107.

correspondant aux fragmentations caractéristiques d'une phosphatidylcholine (tableau) [14]. On observe la présence d'un pic moléculaire à  $m/z$  734 correspondant à la dihexadécanoyl phosphatidylcholine, composé majoritaire (fig. 2,  $n=14$ ), et les pics à  $m/z$  678 (fig. 2,  $n=12$ ) et  $m/z$  790 (fig. 2,  $n=16$ ) correspondant respectivement à la ditétradécanoyl et dioctadécanoyl phosphatidylcholine en mélange.

Les ions à  $m/z$  468,  $m/z$  496 et  $m/z$  524 correspondent au départ d'un des acides gras estérifiant le glycérol.

TABLEAU

Ions dus à la fragmentation du résidu phosphorylcholine.  
Characteristic fragment ions observed for phosphorylcholine residue.

ions	$m/z$
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH} \\   \\ \text{CH}_2\text{-O-P-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{(CH}_3\text{)}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	224
$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{OH-P-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{(CH}_3\text{)}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	184
$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{O=P-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{(CH}_3\text{)}_3 \end{array}$	166
$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{O}^+ \\   \quad   \\ \text{P} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{O-CH}_2 \\   \\ \text{O-CH}_2 \end{array}$	125

DISCUSSION. — Des inducteurs de résistance de nature phospholipidique ont déjà été décrits dans le couple *P. infestans*-pomme de terre ([4]-[7]) et le couple *P. capsici*-piment.

Dans ce dernier système, l'éliciteur connu est un sphingophospholipide à inositol [8]. Il apparaît donc que chez *P. capsici*, les lipides présentent une importance prépondérante dans les phénomènes d'élicitation de la résistance induite.

La présence de choline dans le nouvel éliciteur décrit ici pourrait expliquer l'activité inductrice sur des plantes aussi différentes que le piment ou le blé.

Note remise le 15 avril 1991, acceptée après révision le 22 juillet 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. J. KURANTZ et R. M. ZACHARIUS, *Physiol. Plant Pathol.*, 18, 1981, p. 67-77.
- [2] M. J. KURANTZ et S. F. OSMAN, *Physiol. Plant Pathol.*, 22, 1983, p. 363-370.
- [3] I. B. BRYAN, W. G. RATHMELL et J. FRIEND, *Physiol. Plant Pathol.*, 26, 1985, p. 331-341.
- [4] R. M. BOSTOCK, A. J. KUC et R. A. LAINE, *Science*, 212, 1981, p. 67-69.
- [5] C. B. BLOCH, P. J. G. M. DE WIT et A. J. KUC, *Physiol. Plant Pathol.*, 25, 1984, p. 199-208.
- [6] D. A. DAVIS et W. W. CURRIER, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 28, 1986, p. 431-441.
- [7] J. R. CREAMER et R. M. BOSTOCK, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 28, 1986, p. 215-225.
- [8] O. LHOMME, M. BRUNETEAU, C. E. COSTELLO, P. MAS, P.-M. MOLOT, A. DELL, P. R. TILLER et G. MICHEL, *Eur. J. Biochem.*, 191, 1990, p. 203-209.
- [9] P. MAS et P.-M. MOLOT, *Ann. Phytopathol.*, 6, 1974, p. 237-244.
- [10] A. M. HEAPE, H. JUGUELIN, F. BOIRON et C. CASSAGNE, *J. Chromatog.*, 322, 1985, p. 391-395.
- [11] V. E. VASKOVSKY et E. Y. KOSTETSKY, *J. Lipid Res.*, 9, 1968, p. 936.
- [12] H. WAGNER, L. MORHAMMER et P. WOLF, *Biochem. Zeitsch.*, 334, 1961, p. 175-184.
- [13] O. H. LOWRY, N. R. ROBERTS, N. Y. LEINER, M. L. WU et A. R. FARR, *J. Biol. Chem.*, 207, 1965, p. 1-17.
- [14] G. R. FENNICK, J. EAGLES et R. SELF, *Biomed. Mass Spectrom.*, 10, 1983, p. 382-386.

V. P., M. B. et G. M. : *Laboratoire de Biochimie microbienne,  
Université Claude-Bernard, Lyon-I, 69622 Villeurbanne Cedex;*

P. M. et P.-M. M. : *I.N.R.A., Centre de Recherches agronomiques d'Avignon,  
Station de Pathologie végétale, domaine Saint-Maurice, 84140 Montfavet.*

## Reassertion of morphology and physiology in cytoplasm-enriched fragments of *Nitella*

Mary J. BEILBY and Virginia A. SHEPHERD

**Abstract** — The intact cells and cytoplasm-enriched fragments of *Nitella furcata* were injected with 6-COOH-F. In the former the dye was sequestered into the vacuole in minutes, in the latter the dye was excluded from vesicles and newly formed vacuoles, suggesting that the membrane surrounding them is different to the tonoplast. After several days the vacuoles in the fragments behaved similarly to those in the intact cells. The fragments with one nodal complex regenerated into new plants, whereas nodeless fragments failed to regenerate or grow even after several months.

### Rétablissement de la morphologie et de la physiologie chez des fragments cellulaires de *Nitella* enrichis en cytoplasme

**Résumé** — Des cellules intactes et des fragments enrichis en cytoplasme de *Nitella furcata* ont reçu des injections de la sonde fluorescente 6-COOH-F. Dans les cellules intactes, le réactif s'accumulait dans la vacuole en quelques minutes. Au contraire, dans les fragments cellulaires, il était exclu des vésicules et des vacuoles nouvellement formées, ce qui suggère que la membrane entourant ces dernières, n'est pas de même nature que le tonoplaste. Au bout de quelques jours, les vacuoles des fragments retrouvaient un comportement analogue à celui des cellules intactes. Les fragments associés à un complexe nodal conduisaient à la régénération de nouvelles plantes, alors que ceux dépourvus de nœuds ne manifestaient ni régénération ni croissance, même après plusieurs mois.

**Version française abrégée** — La technique consistant à rassembler, par centrifugation, le cytoplasme à une extrémité de cellules internodales de *Chara* ou de *Nitella* a déjà été utilisée pour obtenir des échantillons de cytoplasme [1] ou pour injecter de l'aequorine [2]. Des fragments cellulaires enrichis en cytoplasme ont également été préparés par ligature de la cellule, en vue d'études électrophysiologiques [3]. On pensait ainsi obtenir des systèmes à compartimentation simplifiée, et où le cytoplasme serait aisément accessible aux micro-électrodes [4]. Toutefois, la simplification de la compartimentation ne fut pas une réussite totale [5] : après la centrifugation, les fragments cellulaires contenaient de nombreuses vésicules, entraînées dans le mouvement de cyclose cytoplasmique, et où le pompage de protons semblait inversé; c'est seulement après quelques jours qu'une grande vacuole centrale se formait, dont le comportement devenait analogue à celui des vacuoles des cellules intactes. Ainsi, ces fragments cellulaires constituent un bon modèle expérimental pour l'étude de la formation de la vacuole et du rétablissement de la morphologie et de la physiologie de la cellule.

Des fragments cellulaires enrichis en cytoplasme furent préparés par centrifugation de cellules internodales de *Nitella furcata* à 1 g pendant 5 mn, puis par ligature de l'extrémité enrichie en cytoplasme à l'aide d'un fil de soie. Du réactif fluorescent 6-COOH-F (6 carboxyfluoresceine) fut injecté à des cellules intactes, comme à des fragments cellulaires [5]. Dans les cellules intactes, le réactif s'accumulait dans la vacuole en quelques minutes [6]. Dans les fragments cellulaires, la complexité de la structure du cytoplasme [7] devenait apparente (*fig. 1, a et b*). Il existait de grandes vésicules [5], de 10 à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre, où l'on n'observait aucune pénétration du réactif fluorescent pendant plusieurs heures (*fig. 1, c et d*). Ces vésicules n'étaient pas nécessairement sphériques. La cyclose du cytoplasme marqué formait des motifs en forme de huit, entourant deux zones centrales non

Note présentée par Michel THELLIER.

marquées (*fig. 2*). Dans les fragments cellulaires préparés depuis 24 h, des vacuoles commençaient à apparaître; mais elles n'accumulaient pas le 6-COOH-F, alors qu'elles se coloraient normalement au rouge neutre. Ce n'est qu'après plusieurs jours que les vacuoles accumulaient le réactif fluorescent de la même façon que dans les cellules intactes. Le nombre de vésicules présentes dans le cytoplasme diminuait au cours du temps, bien qu'il en restât encore au bout de 1 mois. Après 1 semaine environ, les cellules d'hiver tendaient à former de nouvelles tiges, alors que celles de printemps et d'été formaient à la fois des tiges et des rhizoïdes. Tout ceci se passait avec des fragments cellulaires restés associés au complexe nodal. Les fragments dépourvus de nœud commençaient par se comporter comme les précédents, et formaient des vacuoles. Après environ 2 semaines, les parois cellulaires nouvellement formées étaient devenues suffisamment résistantes pour qu'on puisse enlever les ligatures. A l'une ou aux deux extrémités on distinguait des structures pointues (*fig. 3 a*), dont il est difficile de reconnaître si elles résultaient de la façon dont la cellule avait été ligaturée ou si elles s'étaient formées par la suite. Au cours des semaines, ces régions manifestaient une faible croissance, en s'allongeant ou changeant de forme (*fig. 3 b*); mais il ne se formait ni tiges ni rhizoïdes, bien que certains fragments aient survécu, avec une vigoureuse cyclose cytoplasmique, pendant plusieurs mois.

La cyclose cytoplasmique correspond à un glissement du réticulum endoplasmique le long de filaments d'actine [8]. La viscosité est d'une Poise [9]. Alors que la vitesse de cyclose n'est pas affectée par une centrifugation à faible vitesse [10], la distribution du réactif fluorescent est 18 fois plus rapide dans les cellules intactes. Il est particulièrement remarquable que ni les vésicules ni les vacuoles nouvellement formées n'accumulent le réactif fluorescent : ceci signifie que la membrane entourant ces organites n'est pas du tonoplaste; il paraît plus probable qu'elle dérive du réticulum endoplasmique [11]. On ne sait pas pourquoi de grandes vésicules apparaissent dans le cytoplasme, d'autant qu'elles ne semblent pas participer à la formation de la vacuole centrale. Il se peut qu'elles jouent un rôle dans la régulation du pH cytoplasmique ([12], [13]). La survie, pendant plus de 1 mois, des fragments dépourvus du nœud était inattendue; mais on n'a jamais observé que ces fragments aient formé de nouvelles cellules, bien que contenant de nombreux noyaux dans leur cytoplasme. Du fait que la réponse gravitropique de la cyclose est empêchée lorsque l'on supprime l'un des nœuds de cellules de *Nitellopsis* [14], il se pourrait que les courants externes (le long de fragments à nœuds amputés ou non) coordonnent la croissance de l'entre-nœud.

---

INTRODUCTION. — The technique of gathering cytoplasm into one end of *Chara* or *Nitella* internodal cell has been employed to obtain samples of cytoplasm [1] or to inject aequorin [2]. The manufacture of cytoplasm-enriched fragments by ligation and their use for electrophysiological measurements was introduced by Hirono and Mitsui [3]. The fragments were thought to provide a system with simplified compartmentation and cytoplasm easily accessible to microelectrodes [4]. However, structural examination of fragments revealed that the simplification of the compartments has not been entirely successful [5]. From the time of centrifugation the fragments contained many vesicles moving around with the cytoplasm. Some of these took up neutral red and turned crimson, suggesting the presence of inward proton pumping. After a few days a large central vacuole formed, similar to that in the intact cells. Thus the fragments provide an excellent opportunity for observation of vacuole formation and general recovery of the cell's original physiology and morphology.

**MATERIALS AND METHODS.** — In this investigation we were concerned with observing the progress of the fragments over long time (days). The fragments made from *Nitella furcata* internodal cells survived for longer periods than those manufactured from *Chara corallina* used in earlier experiments ([4], [5]). Most of the measurements were made in the summer months of 1989-1990 and the young cells exhibited thin, transparent cell walls which were free of epiphyte, and the structures inside the cells were easier to photograph. Some measurements were also made in the winter and spring of 1990.

The preparation of fragments was similar to the procedure used for *Chara* [5]. Internodal cells about 10 cm long were centrifuged at  $\sim 1$  g (plus the normal earth gravity, of course), for 20 min. The cells were then wilted and the cytoplasm-rich portion tied off with a silk thread. To prepare nodeless fragments, the intact cell was wilted and one node tied off. Upon recovery, as judged from streaming rate (sometimes the cells were left overnight), the cells were centrifuged as with the node-on fragments. In most fragments the wall re-formed after about 2 weeks and the ligations could be removed by pulling firmly.

The intact cells used as controls in microinjection experiments included the lateral branch cells, which were 5 mm long, close to the length of the fragments. In both intact cells and fragments the 6-COOH-F (6 Carboxyfluorescein) was microinjected as previously described [5] except that negative current pulses of  $-400$  nA were used. For most experiments the cells and fragments were stored in artificial pond water (APW), which consisted from 0.1 mM KCl, 1 mM NaCl, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 mM HEPES and NaOH to adjust pH to 7.5.

The fragments were observed and photographed through Zeiss Orthoplan microscope set up for fluorescence. The yellow fluorescence of 6-COOH-F was observed using a filter combination resulting in blue excitation (KP 490 with a TK 510 dichroic beam splitting mirror and K 515 suppression filter, Zeiss, Wetzlar, Germany). The photographs were taken on Ektachrome (Eastman Kodak) film, 1,600 ASA.

**RESULTS.** — *Intact cells.* — The internodal cell was characterised by the presence of an upwards (toward the apex) and basally directed cytoplasmic stream separated by the helical “neutral line”. Cytoplasm-injected 6-COOH-F travelled in the injected stream (to the left or to the right in a detached horizontal internode) without crossing the neutral zone and changed direction beneath the node. The cytoplasm revealed a complex substructure, consisting of visible domains of lesser or greater staining intensity, some of which appeared to remain coherent as the cell was traversed [6]. The probe was compartmented into the vacuoles of 5 mm internodal cells in 10-13 min. ( $n=5$ ). The fluorescence of 6-COOH-F depends on the pH and a clear colour change from brilliant to dull yellow indicated compartmentation. The probe did not reveal any substructure in the vacuole apart from small irregular bodies and droplets which stained intensely. The vacuole was revealed as a dynamic organelle whose boundaries appear to ripple in concert with cytoplasmic streaming.

*Fragments.* — In freshly manufactured fragments the injected probe moved either toward the node of the ligated end before changing direction (similarly to intact cells). In Figure 1 *a* a fragment is shown 30 min. after ligation and few minutes after injection. Figure 1 *b* follows the same fragment after 15 min., when the dye distributed more evenly through the fragment. Figure 1 *c* was taken straight after *b* and shows vesicles in the cytoplasm which do not admit the dye. Figure 1 *d* depicts a different fragment of similar age, to show that the vesicles are not always spherical and sometimes congregate



in a sponge-like structure near the neutral zone. Repeated circulations of stained cytoplasm formed a "figure-of-eight" configuration (due to the helical arrangement of the cytoplasm-propelling mechanism along the cylinder of the cell) enclosing two central unstained regions which revolved in the cytoplasm (see *Fig. 2*). In further contrast to intact cells after about 3 hrs. the probe appeared evenly distributed throughout the cytoplasm, without the normal appearance of the vacuole and without entering the vesicles.

Fragments which were up to 24 hrs. old still showed vacuoles not readily accessible to 6-COOH-F. Such vacuoles stained normally with neutral red. After several days, however, the vacuoles became larger and the dye entered them in minutes, similarly to intact cells. The number of vesicles in the cytoplasm diminished. On one occasion a vesicle was seen disintegrating in the streaming cytoplasm. The rate of streaming was not affected by this event. However, even after a month, some large vesicles could still be seen. After a week or so the winker cells tended to form new shoots, the spring and summer cells produced shoots and rhizoids. These grew from the node complex and established new plants.

The nodeless fragments behaved in a similar fashion in the early stages and formed vacuoles. After about 2 weeks, the newly laid cell wall became strong enough and the ligations could be removed. One or both ends exhibited pointed structures (*Fig. 3 a*). It is not clear whether these resulted from the way the cell was ligated or whether they formed afterwards. Over weeks these regions exhibited limited growth, elongating or changing in shape (*Fig. 3 b*). No shoots or rhizoids formed, although some fragments continued to live and stream vigorously for several months.

DISCUSSION. — The substructural domains visible in the streaming cytoplasm of the intact cells have been described previously [7]. In the fragments the mass of the cytoplasm is much greater and the structure is even more obvious (see *Fig. 1*). The vacuole-like space forms almost immediately after fragment manufacture (see *Fig. 1*). Cytoplasmic streaming in charophytes involves the binding and sliding of endoplasmic reticulum (ER) along actin filaments [8]. This process is less efficient in the freshly made fragments, which consist almost entirely of cytoplasm. The viscosity of charophyte cytoplasm is 1 Po [9], one thousand times that of water and sufficient to limit diffusion. While the streaming rate is not affected by low speed centrifugation [10], the dye distribution in intact cells is 18 times faster. This behaviour in intact cells arises from the intimate relationship of the vacuole and cytoplasm, which facilitates rapid redistribution of the negatively charged hydrophilic molecule into the acidic centre of the cell. The pH gradient between cytoplasm and vacuole suggests that negatively charged probe should be compartmented by the cytoplasm rather than by the vacuole, so its uptake may be active. Without the vacuole this uptake does not occur and the mixing in the central region is retarded. It is puzzling that both the newly formed vacuoles and the vesicles remain free of dye for hours. This suggests that the membranes surrounding the new vacuole and the vesicles are different to the tonoplast, at least initially. The ER seems to be an obvious candidate [11].

Why do the large vesicles form in the cytoplasm? They do not seem to play a part in the formation of the central vacuole. On the other hand some cultures of *Nitella flexilis* have been observed to have many vacuoles (similar to our vesicles) without centrifugation [12]. So perhaps the vesicles can fulfil the role of a central vacuole, if the cell does not succeed in making one. They can certainly pump in  $H^+$  [5] and so

possibly contribute to cytoplasmic pH regulation. This role might be important, as the cytoplasmic buffering capacity declines at low pH [13] and the plasmalemma pumps have much greater volume of cytoplasm to look after. Another function for the vesicles could be associated with keeping  $\text{Ca}^{++}$  concentration low in the cytoplasm. However, the observed bursting of a vesicle was not associated with disturbance to cyclosis and this seems to contradict the idea.

The process of recovery is complete when the formation of rhizoids and shoots occurs. It is interesting that rhizoids form less frequently in the winter cells. This finding further highlights the differences between winter and summer cells [6]. The growth of new plants is not a surprise, as excised nodes are sufficient for this process. The survival of the nodeless fragments for more than a month is somewhat unexpected. Such a system probably constitutes the largest single isolated living plant cell! So far the nodeless fragments have not been observed to form new cells, although many nuclei are present in the cytoplasm. Their growth is limited and lacks direction. A recent paper by Wayne *et al.* [14] describes a gravitropic response in velocity of streaming in vertical cells of *Nitellopsis*. This response is disrupted when even one node is amputated. A comparison of external currents around nodeless and node-on fragments might yield the signal that coordinates the growth of the internode.

Note remise le 14 juin 1991, acceptée le 9 juillet 1991.

#### REFERENCES

- [1] M. TAZAWA, U. KISHIMOTO and M. KIKUYAMA, *Plant Cell Physiol.*, 15, 1974, pp. 103-110.
- [2] R. E. WILLIAMSON and C. C. ASHLEY, *Nature*, 296, 1982, pp. 647-651.
- [3] C. HIRONO and T. MITSUI, In A. G. MATSUMOTO and M. KOTANI Eds., *Nerve Membrane*, Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 1981, pp. 135-149.
- [4] M. J. BEILBY and M. R. BLATT, *Plant Physiol.*, 82, 1986, pp. 417-422.
- [5] M. J. BEILBY and V. A. SHEPHERD, *Protoplasma*, 148, 1989, pp. 150-163.
- [6] V. A. SHEPHERD and P. B. GOODWIN, *Plant Cell Environ.*, 1991 (in press).
- [7] K. LUBY-PHELPS and D. LANSING TAYLOR, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 10, 1988, p. 28-37.
- [8] B. KACHAR and T. S. REESE, *J. Cell Biol.*, 106, 1988, p. 1545-1552.
- [9] M. KAMITSUBO, M. KIKUYAMA and I. KANEDA, *Protoplasma* (suppl. 1), 1988, pp. 10-14.
- [10] M. KAMITSUBO, Y. OHASHI and M. KIKUYAMA, *Protoplasma*, 152, 1989, pp. 148-155.
- [11] T. BOLLER and A. WIEMKEN, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 37, 1986, pp. 137-164.
- [12] B. A. SILVERBERG and T. SAWA, *J. Exp. Bot.*, 25, 1974, pp. 230-243.
- [13] K. TAKESHIGE and M. TAZAWA, *Plant Physiol.*, 89, 1989, pp. 1049-1052.
- [14] R. WAYNE, M. P. STAVES and A. C. LEOPOLD, *Protoplasma*, 155, 1990, pp. 43-57.

M. J. B. : *School of Biological Sciences,  
A 12, University of Sydney, NSW 2006, Australia;*

V. A. S. : *Department of Horticulture, School of Crop Sciences,  
University of Sydney, NSW 20006, Australia.*

## EXPLANATION OF THE PLATE

Fig. 1. — (a) A fragment manufactured from a young internodal cell of *Nitella*. The injection of 6-COOH-F was performed 30 min. after centrifugation and ligation. The picture was taken 5 min. after injection. Note large "empty" space with no dye. This empty space moved around with the streaming. Bar = 650  $\mu\text{m}$ . After 15 min. the dye was distributed more evenly, but domains in the cytoplasm were still visible (b). Bar = 650  $\mu\text{m}$  (c). The vesicles in the cytoplasm, however, still did not admit the dye. This photograph was taken immediately after (b). Bar = 20  $\mu\text{m}$ . (d) Another example of the vesicles not admitting the dye. This fragment was freshly made and photographed 5 min. after injection. Note that the vesicles in this fragment are elongated rather than spherical. Bar = 20  $\mu\text{m}$ . Fluorescence microscopy.

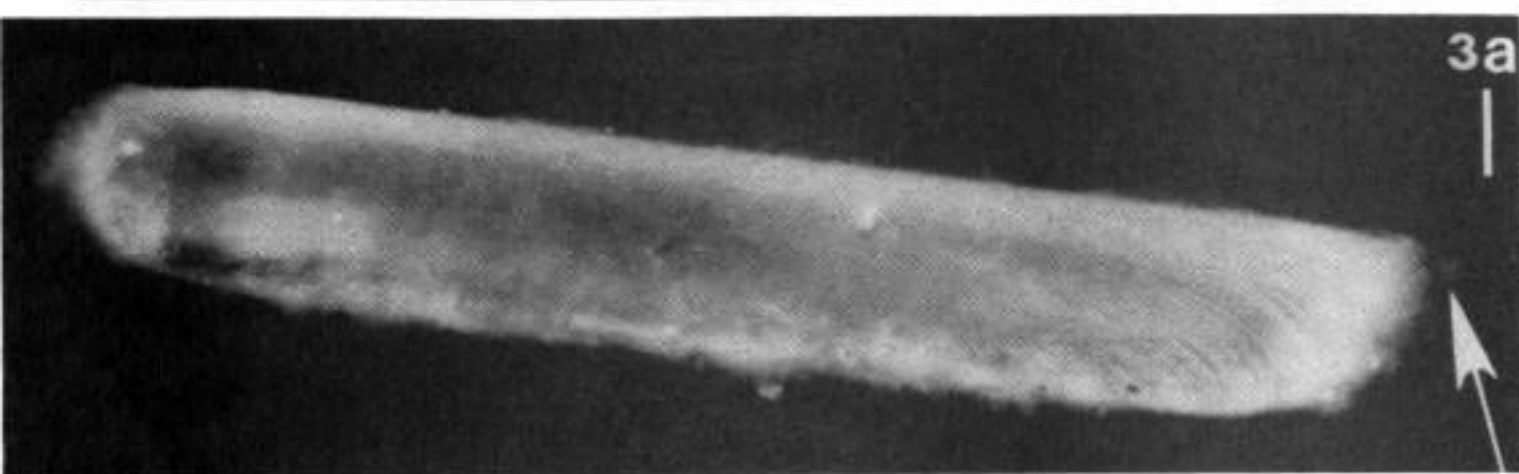
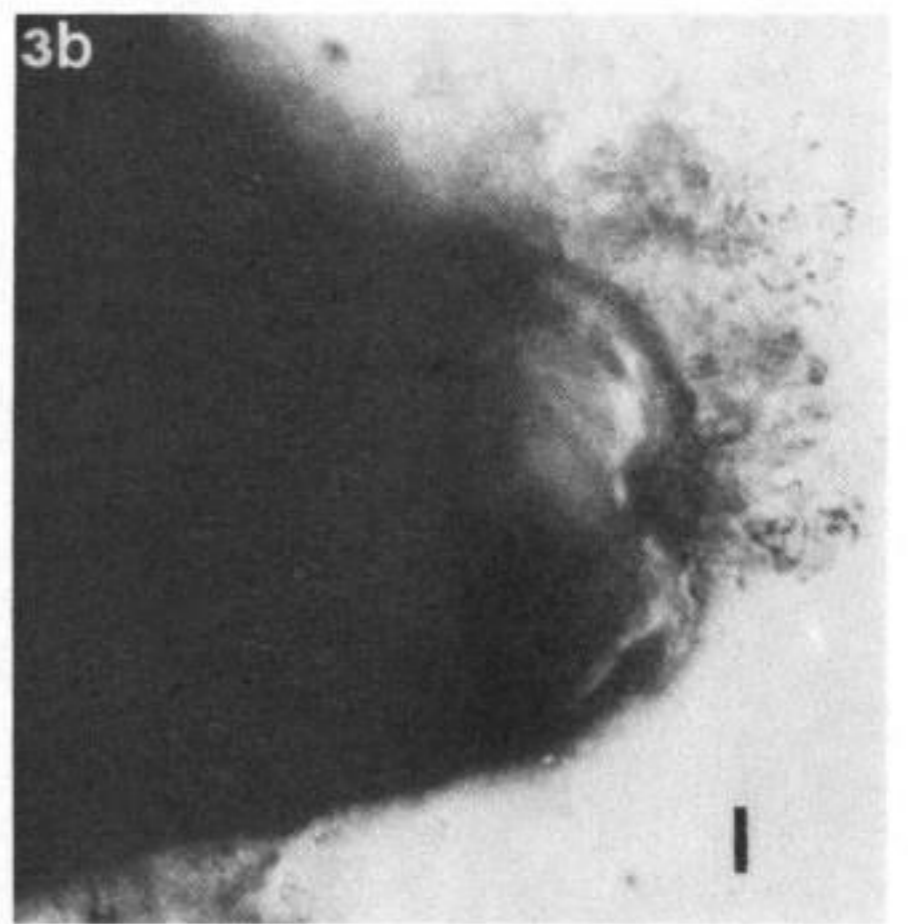
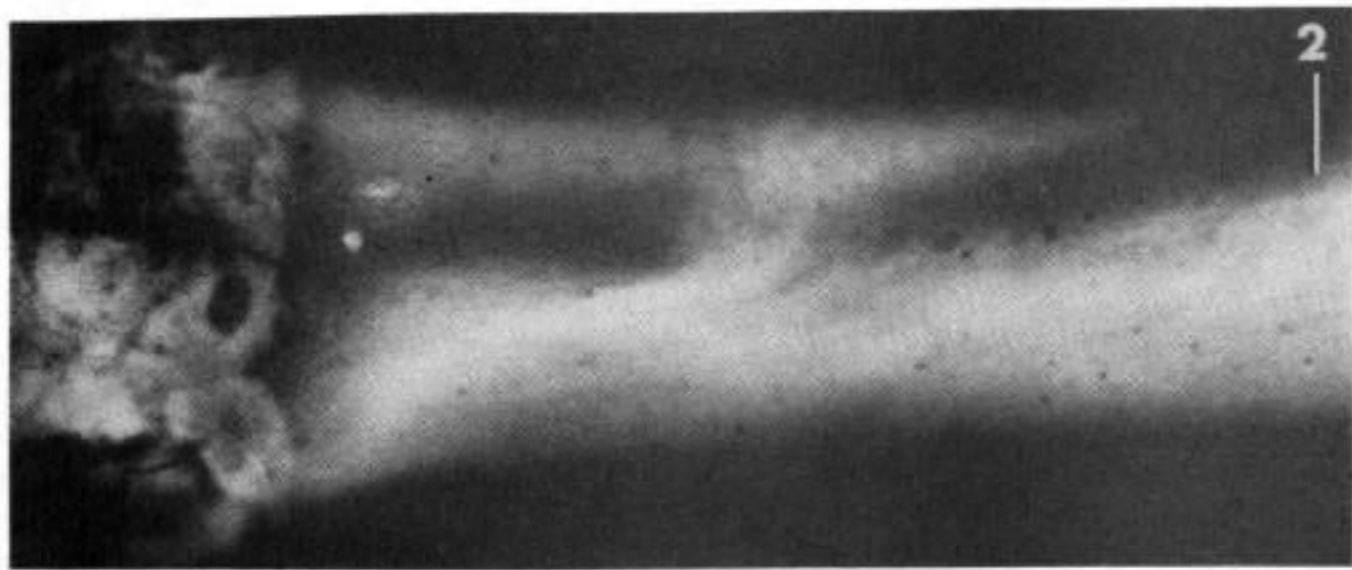
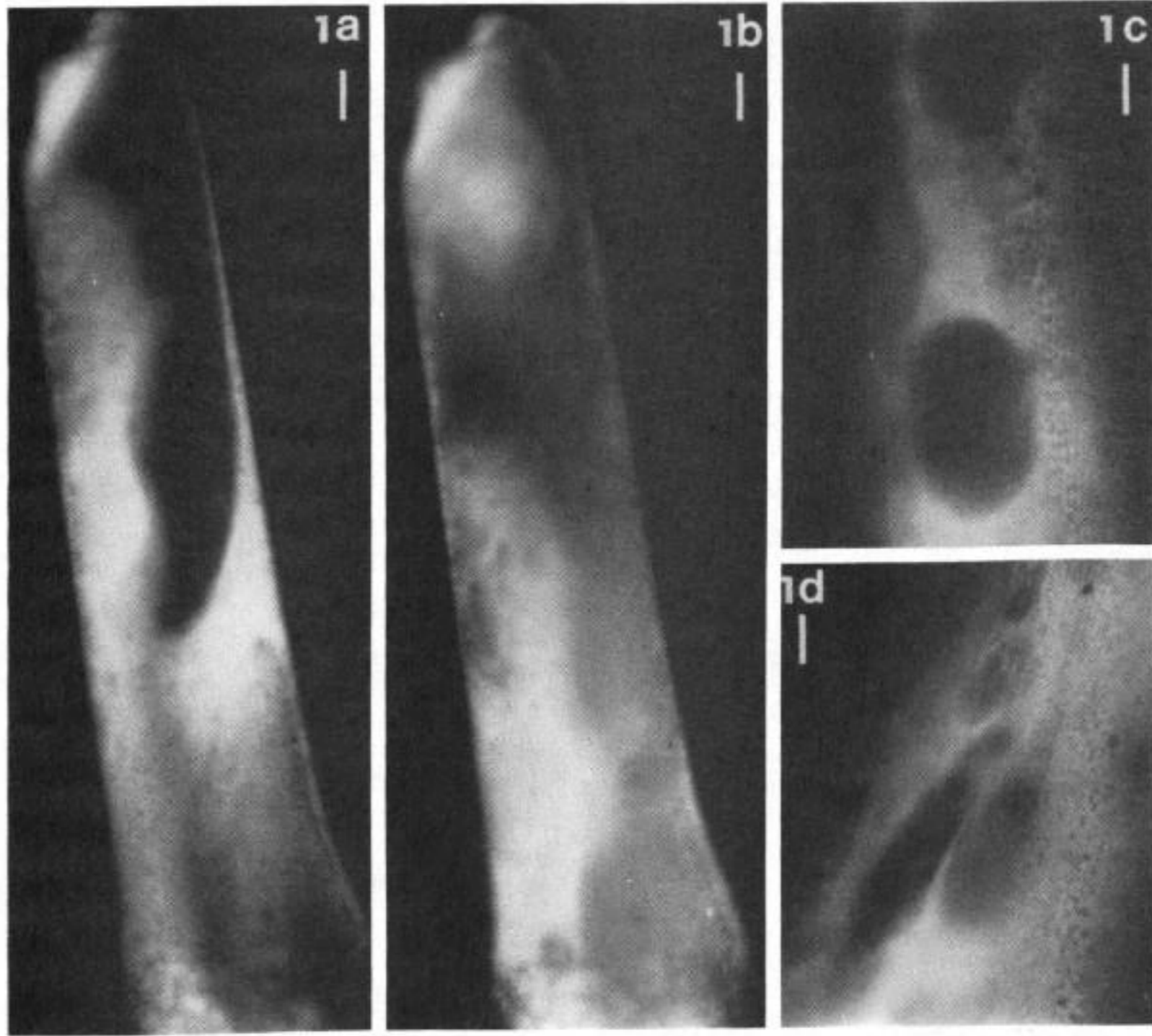
Fig. 1. — (a) Fragment cellulaire préparé à partir d'une jeune cellule internodale de *Nitella*: une injection de 6-COOH-F a été faite 30 mn après centrifugation et ligature de la cellule, et la photographie a été prise 5 mn après l'injection; on note la présence d'une zone importante où ne pénètre pas le réactif; cette zone « vide » se déplace suivant la cyclose cytoplasmique. (b) Après 15 mn, la distribution du réactif tend à devenir plus homogène, bien que l'on continue à pouvoir distinguer différents domaines dans le cytoplasme. (c) Dans une photographie prise immédiatement après la précédente, on constate que le réactif ne pénètre toujours pas dans les vésicules cytoplasmiques. (d) Dans un fragment préparé et photographié 5 mn après l'injection, on constate à nouveau que le réactif ne pénètre pas dans les vésicules; on note également que, dans ce fragment, les vésicules sont allongées plutôt que sphériques. L'échelle est donnée par les barres verticales, correspondant à 650  $\mu\text{m}$  pour les photographies (a) et (b), et 20  $\mu\text{m}$  pour (c) et (d).

Fig. 2. — 30 min. old fragment, 8 min. after injection of 6-COOH-F. There are two distinct empty areas, arising in the quiescent zones of the cytoplasmic streaming which traces the "figure-of-eight" pattern. Bar = 400  $\mu\text{m}$ . Fluorescence microscopy.

Fig. 2. — Fragment cellulaire préparé depuis 30 mn et observé 8 mn après injection de 6-COOH-F. On distingue deux zones vides de réactif. Elles apparaissent dans les zones calmes de cyclose cytoplasmique, faisant apparaître un motif « en forme de huit ». Les observations sont faites en microscopie de fluorescence. La barre verticale correspond à 400  $\mu\text{m}$ .

Fig. 3. — (a) The nodeless fragment, which survived for about three months. The fuzzy appearance is caused by epiphytes. Note the way the chloroplast rows curve round at the right end. This end also forms a point (arrow). Bar = 1 mm. (b) The pointed end of the nodeless fragment exhibiting limited growth. No chloroplasts are laid in this new part of the cell. The fuzzy area is again due to epiphytes. Bar = 5  $\mu\text{m}$ . Light microscopy.

Fig. 3. — (a) Fragment cellulaire dépourvu de nœud, et dont la durée de survie est d'environ 3 mois; l'aspect floconneux est dû à la présence d'épiphytes; noter la façon dont les rangs de chloroplastes tendent à s'enrouler, à la partie droite de la photographie; cette extrémité forme également une pointe (marquée par la flèche). (b) Extrémité pointue d'un fragment dépourvu de nœud et présentant une croissance limitée; on ne trouve pas de chloroplastes dans cette partie nouvellement formée de la cellule; l'aspect floconneux est dû à nouveau à la présence d'épiphytes. Les observations sont faites en microscopie optique. L'échelle est donnée par les barres verticales correspondant à 1 mm et 5  $\mu\text{m}$  pour les photographies (a) et (b) respectivement.





## Une nouvelle activité enzymatique au niveau des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll. Arg. : L'ATP-AMP-phosphotransférase

Isabelle NAUD, Christophe BRUGIDOU, Zakia AMALOU et Bernard MARIN

**Résumé** – Le latex d'*Hevea brasiliensis* contient une fraction membranaire, vésiculée, équivalente au système vacuo-lysosomal des végétaux supérieurs. Elle est décrite sous le vocable de lutoïdes.

Maintes fois, il a été rapporté une activité ATPase membranaire, mesurée par la libération du phosphate à partir de l'ATP hydrolysé. Dans cet article, il est proposé de l'étudier en suivant l'évolution du pool adénylique au cours de la réaction, en séparant simultanément les différents adénylates par chromatographie liquide haute performance.

Force est de constater que la corrélation existant entre l'ATP hydrolysé et l'ADP formé ne résulte pas de la simple activité ATPase membranaire jusqu'à présent identifiée. Il est suggéré l'existence d'autres activités enzymatiques membranaires utilisant l'ATP comme substrat. Il est évoqué l'existence d'une activité adénylate-kinase (E.C.2.7.4.3.). La synthèse d'une molécule d'ATP se ferait à partir de la condensation de deux molécules d'ADP. Il en résulterait l'apparition d'une molécule d'AMP. Comme l'Ap<sup>5</sup>A s'avère un inhibiteur efficace de cette réaction, il s'agirait d'une activité ATP-AMP-phosphotransférase.

L'équipement enzymatique de la membrane lutoïdique permettrait de mieux utiliser l'énergie disponible dans les différents transferts bidirectionnels de solutés entre le cytoplasme et le milieu vacuolaire.

### A new enzymatic activity lutoidal membrane from latex of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg.: ATP-AMP-phosphotransferase

**Abstract** – The latex of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. contains a vesicular membrane fraction called lutoid, which can be regarded as the equivalent of the vacuolar compartment of higher plant cells.

Among the different enzymatic activities described as a intrinsic component of the lutoidal membrane, an ATPase activity has been characterized. This activity could be studied on lyophilized material without loss of activity. In this paper, this activity was examined using an HPLC separation and quantification of adenylic nucleotides.

Our results suggested the existence of additional activities which can use ATP as substrate. Thus, one of them has been characterized as an adenyate-kinase. When ADP was added to a lutoid suspension, AMP appearance and concomitant ATP synthesis were observed. A stoichiometry could be suggested as follows:  $2ADP \rightarrow 1ATP + 1AMP$ . This reaction was inhibited by Ap<sup>5</sup>A. Such activity could be regarded as an ATP-AMP-phosphotransferase. No report has been published up to now on the occurrence of a lutoidal phosphotransferase activity in *Hevea* latex.

The enzymatic equipment of the lutoidic membrane could be considered as efficient for an optimization of the energy-consuming systems involved in the bidirectional transfert of solutes between the cytoplasm and the intra-vacuolar medium. This enzyme could take part in a regulation process of ATP regeneration, supplying the substrate for the ATPase activity.

**Abridged English Version** – The latex of *Hevea brasiliensis* Müll Arg. (rubber tree) consists of the fluid cytoplasmic content of the laticiferous cell. Lutoids are identified as a vesicular fraction which, according to enzymatic and cytological criteria, can be regarded as equivalent to the vacuolar compartment of higher plant cells ([1]-[2]).

**MATERIAL AND METHODS.** – Latex was obtained from selected trees of *Hevea brasiliensis* (clone GT<sub>1</sub>) growing on the experimental plantation of I.R.C.A. (Institut de Recherches sur le Caoutchouc en Afrique, Bimbresso, Ivory Coast, Africa). The lutoids were prepared according to [3]. Finally, the organelles were dispersed in a buffered medium containing 25 mM MES, 25 mM HEPES, 1 mM DTT, 1 mM EDTA and 5 mM MgSO<sub>4</sub>, adjusted to pH 7.0 with Tris-base. The procedure used allowed the preparation of a highly purified tonoplast membrane fraction that corresponded to a population of tightly sealed vesicles.

Note présentée par Alexis MOYSE.

Membrane suspension was sampled for the estimation of ATPase activity by different methods [3]. On the other hand, this activity was calculated from the adenylate determinations carried out according to M. Hill *et al.* ([7]-[8]). Proteins were estimated by the method of M. Bradford modified by M. Hill *et al.* [8].

RESULTS AND DISCUSSION. — Some enzymes are bound to the lutoidal membrane, especially an ATP-hydrolyzing enzyme (ATPase) which has been well characterized [4] and a  $NADH_2$ -cytochrome *c*-oxydoreductase which has been described recently [5]. These two enzymes were involved in the transport of protons across the membrane [5]. They contributed to the energization of this membrane producing a transmembrane protonmotive potential difference positive inside ([4]-[6]).

For *Hevea* latex, we have used a new and more specific method to estimate the tonoplast ATPase activity: the HPLC separation and quantification of adenylic nucleotides ([7], [8]). It is possible to follow the simultaneous measurement of changes in adenylic nucleotides during ATP hydrolysis.

Lutoids contained an acid phosphatase activity which can be inhibited completely in the presence of 0.1 mM ammonium molybdate [9]. In these conditions, with lyophilized lutoids, any ATP-consuming activity could be characterized. The HPLC method revealed a lack of stoichiometry between ADP formation and ATP hydrolysis. The expected ratio ATP/ADP was never equal to 1. A slight release of AMP was also observed. ATP seemed to be degraded into ADP and AMP. When ADP was added, AMP and ATP followed a parallel increasing course. AMP appearance and concomitant ATP synthesis were inhibited by  $Ap^5A$  (M. Marin, résultats non publiés). Such a molecule did not inhibit lutoidal ATPase. On the other hand, it inhibited any adenylate-kinase activity described as an ATP-AMP-phosphotransferase [12]. Consequently, the formation of AMP could be the result of an ATP-AMP-phosphotransferase activity associated with the lutoidal membrane.

Such activity was regarded as ubiquitous [14]. In plant cells, the existence of different molecular species of adenylate kinase has been suspected for a long time. For example, in green leaves, a large proportion (about 50 %) of this activity is contained in the chloroplasts, especially in the stroma [14]. Recently, in other tissues, some activity was localized in the mitochondria. Nevertheless, in these two cases, a part of this activity was tightly bound to the membrane, the envelope of the chloroplasts and the inner membrane of the mitochondria, respectively. Such enzymes could represent a significant part of the membrane proteins. The preliminary results reported in this paper contributed to ascribe the occurrence of such an enzyme in an other cellular membrane, the tonoplast.

Consequently, adenylate nucleotides could play a key role in energy transduction as coupling agents in most metabolic sequences even in the latex of *Hevea brasiliensis*. The role of adenylate kinase in the translocation of adenylates between the cytoplasm and the intravacuolar medium could be more important than expected.

---

INTRODUCTION. — Le tonoplaste des végétaux supérieurs est fort mal connu du fait des problèmes liés à son isolement et à son caractère natif [1]. Or, le latex d'*Hevea brasiliensis* est le seul matériel biologique qui puisse permettre d'obtenir une membrane biologique ayant des propriétés voisines de ce tonoplaste sans avoir perdu ses propriétés natives [2]. Dès lors, il devient possible de mieux caractériser cette membrane.

Ainsi, il a été mis en évidence des activités vectorielles liées au fonctionnement de l'adénosine-triphosphatase (ATPase) [14] et de la  $NADH_2$ -cyt *c*-oxydoréductase [5].

Depuis, cela a été observé chez de nombreux autres végétaux supérieurs [6]. Toutefois, du moins, pour ce qui concerne l'activité ATPase, en particulier, lorsque cette dernière est mesurée par HPLC, le bilan nucléotidique suggère l'existence d'une activité ATP-AMP-phosphotransférase (plus communément appelée adénylate-kinase, E.C.2.7.4.3.).

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — *Matériel végétal et préparation des lutoïdes.* — Le latex d'*Hevea brasiliensis* Müll. Arg. est récolté en pratiquant une saignée sur une quarantaine d'arbres de même âge [3]. Il est recueilli directement dans un flacon d'Erlenmeyer, refroidi par de la glace, sur place. Il est centrifugé à 15 000 g pendant 15 mn, à 4°C. Le sédiment, riche en lutoïdes, contient aussi des particules de Frey-Wyssling. Quatre lavages successifs sont effectués pour les éliminer. Le dernier culot est lyophilisé dans une boîte de Petri.

*Préparation de la suspension lutoïdique.* — 50 mg de lutoïdes lyophilisés sont mis en suspension dans 5 ml de TpR (25 mM MES, 25 mM HEPES, 1 mM DTT, 1 mM EDTA et 5 mM MgSO<sub>4</sub>, pH ajusté à 7,0 par addition de Tris-base). Cette préparation est impérativement effectuée à 4°C. La réimbibition dure 30 mn. La suspension est homogénéisée à l'aide d'un broyeur du type Potter, la rotation du piston en téflon n'excédant pas 100 tr/mn. La suspension est centrifugée à 4 500 g pendant 5 mn à 4°C. Le sédiment est repris par 10 ml de milieu TpR. Après deux lavages, les lutoïdes sont remis en suspension dans 3 ml de milieu TpR sans Mg<sup>2+</sup> et conservés dans la glace jusqu'au moment de leur utilisation.

*Dosage de l'activité enzymatique.* — Chaque échantillon est préparé dans un milieu TpR sans Mg<sup>2+</sup>, en présence ou non de 0,1 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>. Selon la nature de l'essai, le substrat est ajouté à la concentration finale indiquée dans le texte. Pour la mesure de l'activité ATPase, il est ajouté du MgSO<sub>4</sub> de façon à obtenir une concentration finale de 6 mM. Le milieu d'incubation est ajusté à pH 7,0 par addition d'une solution saturée de Tris-base.

Chaque essai est incubé dans un bain thermorégulé sous agitation à 30°C. La réaction enzymatique est stoppée par l'addition d'un volume égal d'acide trichloracétique préparé à 4 % (vol./vol.) à 0°C. Une fois les protéines précipitées, elles sont éliminées par centrifugation. Chaque surnageant est congelé à -30°C. Il est neutralisé par l'addition de NaOH 2 N, une fois décongelé, juste avant l'analyse du pool adénylique par HPLC. L'activité ATPase est exprimée en nmoles d'ATP hydrolysées par minute et par milligramme de protéines.

*Détermination du pool adénylique.* — La méthode employée s'inspire de celle décrite par M. Hill et coll. [7].

A l'aide d'un auto-injecteur « Philips PU 4700 », 25 µl sont déposés sur un ensemble chromatographique composé d'une précolonne « Brownlee RP-18 » (7 µm, 3,2 × 1,5 mm) et d'une colonne « Supelcosil LC-18-DB » (5 µm, 150 × 4,6 mm). Au préalable, l'ensemble a été lavé par un milieu tamponné constitué de 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et de 25 mM TBAHS, ajusté à pH 7,0 par addition de NaOH. L'élution se fait avec ce même milieu, en présence de méthanol (18 % (vol./vol.)). Le chromatographe haute pression « Philips PU 4100 » assure un débit de 1 300 µl par minute à la température ambiante. L'éluat est analysé à 254 nm avec le détecteur « Philips PU 4021 ».

*Dosage des protéines.* — La méthode suivie est celle décrite par M. Bradford et modifiée par M. Hill et coll. [8].

**RÉSULTATS ET DISCUSSION.** — *Validité des conditions employées pour la mesure de l'activité ATPase lutoïdique.* — Par commodité, très souvent, il est rendu compte de l'activité ATPase en suivant la libération du phosphate dans le milieu d'incubation [8]. Or, souvent, il n'est pas tenu compte de la stabilité du phosphate inorganique en milieu acide, une étape limitante dans la plupart des techniques colorimétriques employées jusqu'à présent. D'où le développement de tout un ensemble de méthodes pour mesurer l'hydrolyse de l'ATP (systèmes couplés régénérant l'ATP, libération de <sup>32</sup>P à partir de [γ-<sup>32</sup>P<sub>i</sub>]-ATP, etc.). Une étude préliminaire de cette nature a été effectuée sur le latex d'*Hevea*. Il est vérifié que les résultats obtenus sont équivalents quelle que soit la méthode employée.

Par ailleurs, l'étude de l'ATPase tonoplastique n'est pas sans poser quelques problèmes d'identification lorsque l'activité phosphatase acide (Pase) est importante. Les propriétés lysosomales du compartiment vacuolaire des végétaux supérieurs ont été identifiées depuis longtemps [9]. Les activités vacuolaires hydrolysant l'ATP sont fort nombreuses et mal



connues. Les activités phosphomonoestérase, phosphodiesterase, polyphosphatase et ribonucléasiques lutoïdiques dégradent l'ATP (B. Marin, résultats non publiés). Leur dépendance vis-à-vis du pH (5,0-5,5) les différencie de l'activité ATPase membranaire (6,8-7,0).

La membrane lutoïdique ne présente aucune activité Pase significative en présence de molybdate d'ammonium employé à la concentration de 0,1 mM. Ainsi, en son absence, l'activité hydrolysant l'ATP atteint 28 nmoles/mn/mg de protéines. Par contre, en sa présence, l'activité mesurée n'est plus que de 2 nmoles/mn/mg de protéines. Cette hydrolyse d'ATP non spécifique est imputable à l'activité Pase acide adsorbée sur la membrane lutoïdique [10]. Dès lors, dans ces conditions expérimentales, il est possible de mesurer une activité membranaire (lutoïdique) hydrolysant l'ATP.

*Utilisation de la technique HPLC pour mesurer l'activité ATPase lutoïdique.* — La méthode de M. Hill et coll. ([7]-[8]) permet d'estimer une activité hydrolytique de l'ATP à partir de l'évolution du pool des nucléotides adényliques (AMP, ADP, ATP) au cours de l'incubation. Des essais préliminaires effectués avec différentes activités ATPase le prouvent (M. Marin et B. Marin, résultats non publiés). Il s'agit donc d'une méthode fiable donnant des résultats répétitifs et significatifs. Dès lors, à tout moment, il sera possible de corréler la vitesse de formation d'ADP (par son apparition) à la vitesse d'hydrolyse d'ATP (par sa disparition).

Or, l'activité ATPase s'avère différente selon le mode utilisé pour l'exprimer : 21 nmoles d'ADP formées pour 34 nmoles de  $P_i$  résultant de l'hydrolyse de l'ATP. Par voie de conséquence, la vitesse de formation d'ADP et la vitesse d'hydrolyse d'ATP ne sont pas équivalentes. Cette différence n'est pas liée à la méthodologie employée mais au matériel biologique. Une telle différence n'est jamais observée avec une activité membranaire partiellement purifiée (M. Marin et B. Marin, résultats non publiés).

Lors de l'incubation, lorsque l'ATP est remplacé par de l'ADP, à la même concentration, toujours en présence de  $Mg^{2+}$ , au bout de 60 mn, le contenu en ADP de la suspension prélevée a diminué de 350 nmoles (*fig.*). Or, parallèlement, pendant le même temps, les contenus en ATP et en AMP augmentent respectivement de 142 et de 218 nmoles.

Ces variations du contenu adénylique de la suspension lutoïdique ne sont pas observées en présence d'Ap<sup>5</sup>A (M. Marin, résultats non publiés). Cette molécule n'est pas un inhibiteur de l'activité ATPase lutoïdique. Par contre, elle s'avère efficace sur les différentes activités adénylate-kinase décrites jusqu'à présent ([11]-[12]).

Ainsi, en présence de  $Mg^{2+}$ , il est observé, parallèlement à la disparition de l'ADP, une apparition d'ATP et d'AMP dans un rapport 2/1/1. Cette proportionalité n'est jamais observée en absence de cation divalent dans le milieu réactionnel. Cette dépendance vis-à-vis du magnésium et un tel rapport suggèrent l'existence d'une activité adénylate-kinase, souvent décrite dans le monde animal.

**CONCLUSIONS.** — La membrane lutoïdique dispose d'un équipement enzymatique plus complexe qu'il n'apparaît *a priori*. Certes, il existe une activité ATPase pompe-à-protons [4] mais aussi d'autres activités enzymatiques dont les nucléotides adényliques seraient, soit les substrats, soit les produits de la réaction. Dans ces conditions, il est mesuré un bilan des produits de ces réactions.

L'emploi de la technique HPLC, adaptée, éprouvée et optimisée pour ce matériel biologique permet de mettre en évidence un type d'activité, l'activité adénylate-kinase, qui n'avait jamais été mis en évidence jusqu'à présent sur ce matériel biologique. De par

son inhibition par l'Ap<sup>5</sup>A, il s'agirait davantage d'une activité ATP-AMP-phosphotransférase ([11]-[12]).

Ce type de résultats est à rapprocher de ceux décrits par M. Hill et coll. sur le tonoplaste de *Catharanthus roseus* [13]. De par ses propriétés, cette activité semble différente des autres types d'activité adénylate-kinase trouvés chez les végétaux supérieurs. Selon la nature des tissus, la répartition cellulaire de cette activité s'avère différente [14]. Ainsi, dans une feuille mature, près de 50 % se trouvent dans les chloroplastes, le stroma plus particulièrement. Dans d'autres cas, elle se trouve essentiellement dans les mitochondries. Mais, ce qui semble le plus important, c'est qu'il existe une faible partie de cette activité associée aux membranes de ces organites. Elle a été décrite associée à l'enveloppe des chloroplastes. Elle serait une composante de la membrane interne des mitochondries. Dès lors, il ne serait pas surprenant de la retrouver dans l'équipement enzymatique d'autres membranes cellulaires comme le tonoplaste. Les résultats décrits dans ce papier l'indiquent clairement. Ils confirment ceux obtenus sur le tonoplaste de *Catharanthus roseus* ([7]-[8]). La membrane lutoïdique du latex d'*Hevea brasiliensis* a longtemps été considérée comme représentative d'un système vacuo-lysosomal ([2], [10]). Depuis, elle a été souvent considérée comme trop spécifique pour être représentative du tonoplaste des végétaux supérieurs. Toutefois, ce point de vue mériterait une réflexion plus approfondie.

Dans l'état actuel de nos connaissances sur ce matériel, il devient essentiel de caractériser son rôle dans la compartimentation des nucléotides entre le cytoplasme et la vacuole. Dans le contexte du fonctionnement biochimique et physiologique de la cellule laticifère, le contenu en nicotinamides réduits limite la synthèse d'un poly-isoprène économiquement important, le caoutchouc naturel [15]. D'autres effecteurs de la voie polyisoprénoïde existent. Ils sont l'objet d'un transport directionnel entre le cytoplasme et le milieu vacuolaire [16]. Par ailleurs, dans la mesure où le mécanisme de leur transporteur tonoplastique est connu, il s'avère entraîné par au moins l'ATPase membranaire [17]. Dans ces conditions, l'estimation du pool nucléotidique et celui de la charge énergétique constituent deux paramètres essentiels pour une meilleure connaissance de la productivité de l'*Hevea brasiliensis*.

On pourrait aussi, dans un tel contexte, évoquer les mécanismes liés au recyclage de l'ADP en ATP, une hypothèse qui pourrait être vérifiée avec ce matériel non dégradé. Sa vérification remettrait en cause la plupart des bilans énergétiques calculés pour rendre compte des différents transports actifs au niveau du tonoplaste des végétaux supérieurs.

ABRÉVIATIONS. — ADP : adénosine-5'-diphosphate. AMP : adénosine-5'-monophosphate. AP<sup>5</sup>A : P<sup>1</sup>, P<sup>5</sup>-di(adénosine-5')-pentaphosphate. ATP : adénosine-5'-triphosphate. cyt *c* : cytochrome *c*. DTT : 1,4-dithiothréol. EDTA : acide (éthylène-dinitrolo)-tétraacétique. HEPES : acide 4-(2-hydroxy-éthyl)-1-pipérazine-éthane-sulfonique. HPLC : chromatographie liquide haute performance. MES : acide 2-(N-morpholino)-éthane-sulfonique. NADH<sub>2</sub> : β-nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit. Pase : phosphatase acide. PNP : para-nitro-phénol. TBAHS : tétra-*n*-butyl-ammonium hydrogène sulfate. Tris-base : tris-(hydroxyméthyl)-animo-éthane.

Les auteurs remercient, pour leurs conseils judicieux, Jean-Louis Jacob et Jean-Claude Prévôt (I.R.C.A.). Ils ont apprécié aussi l'assistance technique, chaleureuse, de Jacques Chanut (ORSTOM).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] G. WAGNER, in *Plant Vacuoles: Their importance in solute compartmentation in cells and their applications in plant biotechnology*, NATO ASI Series, Série A, 134, Plenum Press, New York et Londres, 1987, p. 7-19.
- [2] J. D'AUZAC, H. CHRÉSTIN, B. MARIN et C. LIORET, *Physiol. Végét.*, 20, 1982, p. 311-331.
- [3] B. MARIN et X. GIDROL, *Biochem. J.*, 226, 1985, p. 85-94.
- [4] B. MARIN, M. MARIN-LANZA et E. KOMOR, *Biochem. J.*, 198, 1981, p. 365-372.
- [5] H. CHRÉSTIN, X. GIDROL, B. MARIN, J. L. JACOB et J. D'AUZAC, *Z. Pflanzenphysiol.*, 114, 1984, p. 269-277.
- [6] B. MARIN, *Biochemistry and function of vacuolar adenosine-triphosphatase in fungi and plants*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York et Tokyo, 1985, 259 p.
- [7] M. HILL, A. DUPAIX, P. VOLFIN, A. KURKDJIAN et B. ARRIO, in *Plant Vacuoles: Their importance in solute compartmentation in cells and their applications in plant biotechnology*, NATO ASI Series, Série A, 134, Plenum Press, New York et Londres, 1987, p. 127-133.
- [8] M. HILL, A. DUPAIX, P. VOLFIN, A. KURKDJIAN et B. ARRIO in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 148, 1987, p. 132-141.
- [9] D'AUZAC, *Phytochemistry*, 14, 1975, p. 671-675.
- [10] S. PUJARNISCLE, *Étude biochimique des lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis Müll.-Arg. Différences et analogies avec les lysosomes*, Mémoires de l'ORSTOM, 48, 1971, 168 p.
- [11] G. E. LIENHARD et I. I. SECEMSKI, *J. Biol. Chem.*, 248, 1973, p. 1121-1123.
- [12] T. SAIDHA, A. I. STERN, D. LEE et J. SCHIFF, *Biochem. J.*, 232, 1985, p. 357-365.
- [13] M. HILL, A. DUPAIX, M. NHIRI, L. GUYEN et B. ARRIO, *F.E.B.S. Letters*, 230, 1988, p. 47-50.
- [14] A. PRADET et P. RAYMOND, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 34, 1983, p. 199-224.
- [15] J. LORQUIN, *Thèse Doctorat*, Spécialité Biochimie, Biologie moléculaire et cellulaire, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 1990, 204 p.
- [16] B. MARIN, *Plant vacuoles: their importance in solute compartmentation in cells and their applications in plant biotechnology*, NATO ASI Series, série A, 134, Plenum Press, New York et Londres, 1987, 562 p.
- [17] B. MARIN, *Le Fonctionnement du Transporteur tonoplastique du Citrate du Latex d'Hevea brasiliensis*, Trav. Doc. ORSTOM, 144, 1982, p. 1-409.

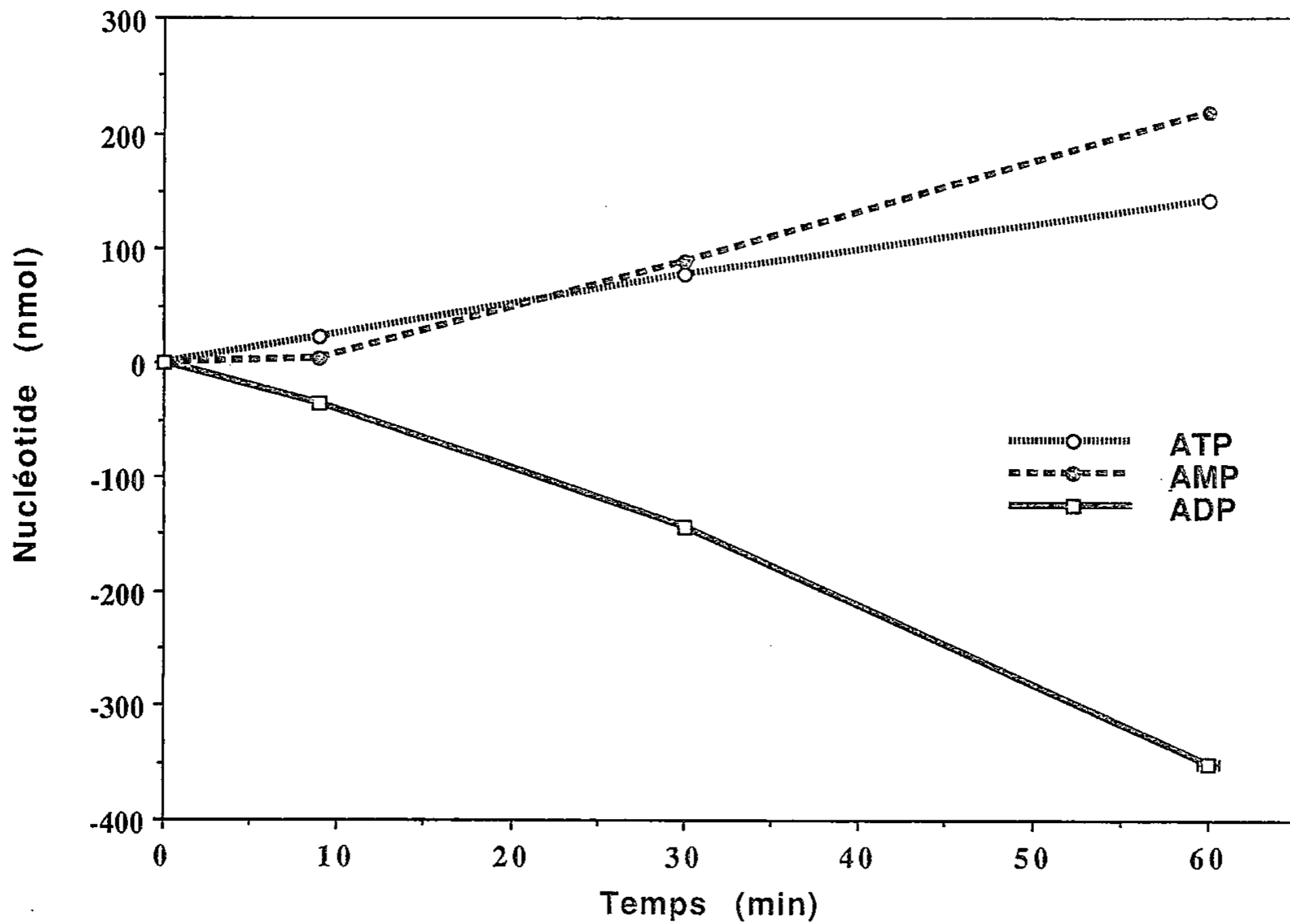
---

Laboratoire de Biotechnologie, ORSTOM, B.P. n° 5045, 34032 Montpellier Cedex 1;

I. N. : Nouvelle adresse : Laboratoire de Biochimie microbienne,

Département de Biologie moléculaire et structurale,

Centre d'Études nucléaires de Grenoble 85 X, avenue des Martyrs, 38041 Grenoble Cedex.



Cinétique de l'évolution du contenu nucléotidique au cours d'une incubation. Chaque essai représente la moyenne de quatre répétitions faites dans les mêmes conditions expérimentales. Il représente le contenu nucléotidique d'un échantillon de 25  $\mu$ l analysé par HPLC selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes.

*Changes in the level of adenine nucleotides during the incubation of hevea lutoïdic vesicles. The data points for each nucleotide represent the mean of four experiments. The adenylate content of a 25  $\mu$ l sample is analyzed by HPLC according to the procedure described in Material and Methods.*



Agronomie/Agronomy

## Détermination d'un niveau de sécheresse sur des couverts prairiaux à partir de valeurs radiométriques visible et proche infrarouge

Marc BENOIT, Jean-François THOMAS et Colette M. GIRARD

*Résumé* — Les différentes étapes de la mise au point d'un estimateur du niveau de sécheresse de prairies permanentes sont présentées. L'établissement de l'estimateur se fait à partir de données de réflectance mesurées sur le terrain en Lorraine, il est ensuite comparé avec des données de Normandie.

### Determination of dryness of grasslands: use of field radiometric data from visible and near infrared

*Abstract* — Different steps for elaborating an estimate of dryness of grasslands from field spectral reflectance data measured in Lorraine are presented and compared with Normandy data.

*Abridged English Version* — I. INTRODUCTION. — Over the past 4 years dry periods have modified grassland species growth [1] and lessened grass production. A non-destructive estimate was elaborated using field data collected in Lorraine in 1986 and 1987 to determine the dryness of grasslands. This method is based on spectral reflectance characteristics ([2], [3], [4]).

II. METHOD. — The test site and field data collection have already been presented [5] and [6]. Data concern 38 grasslands with 200 sets of 5 measurements. Data handling and processing were performed at Mirecourt (Vosges). Data analysis consisted of research of relationships between green and dry matter versus reflectance measurements, through simple and multiple regressions (Excel, Cricket Graph and Cartography 2D programmes).

III. RESULTS. — Different descriptors of water content may be used. The coefficient  $J = (GM - DM)/GM$  (GM = green matter, DM = dry matter) was selected as more sensitive to dry situations. Red (R) and near infrared (IR) wavebands, poorly correlated and sensitive to chlorophyll state of vegetation [4], were selected. Regressions between J values versus R and IR reflectances as well as reflectances ratios: IR/R,  $(IR - R)/(IR + R)$  (ND), were then computed. The following simple regressions:

$$Y_0 = 0.026 \text{ IR/R} + 0.4783, \quad r = 0.70;$$

$$Y_1 = 0.7902 \text{ ND} + 0.1015, \quad r = 0.78;$$

and multiple regressions:

$$Y_2 = -0.022 \text{ R} + 0.0049 \text{ IR} + 0.59, \quad r = 0.8137;$$

$$Y_3 = -0.001 \text{ R} - 0.001 \text{ R}^2 + 0.0048 \text{ IR} + 0.51, \quad r = 0.8213,$$

were then compared. Y<sub>2</sub> and Y<sub>3</sub> were selected as presenting the higher correlation coefficients  $r$ . The histograms (Fig. 1) of Y<sub>2</sub> and Y<sub>3</sub> values compared to J are rather similar. Their efficiency in classifying the dryness of grasslands was compared in order to select the better one. It is performed on the basis of 5 dryness classes: very wet, wet, normal, dry, very dry. These classes may be recognized in the field through grassland physiognomy and species phenological states, while the limits are determined by the Jenks method [7]: the sum of standard errors within each class must be minimum. Y<sub>2</sub> and Y<sub>3</sub>

Note présentée par Alexis MOYSE.

classifications are compared to J (Fig. 2) with similar results: Y2: 56 % grasslands well classed (shift 0) and 94% one class discrepancy (shift -1; +1); Y3: 52% (shift 0) 95% shift (-1; +1). An overestimation of dryness state is noted both for Y2 and Y3 (higher with Y3); Y2 was selected as a better estimate.

IV. TESTING AND CONCLUSION. — The model was tested and its possible use for other grassland areas was evaluated with data measured in Pays d'Auge (Calvados) between August the 9 and 14th 1990. Due to severe drought conditions at this period, dryness was only identified from field observations in four classes: wet, normal, dry and very dry. Y2 values, computed from the field reflectance data, were compared to dryness classes on the basis of Lorraine's results: 74% correctly classified, 26% one class discrepancy (dry instead of very dry) [8]. Once again underestimation of dryness state by Y2 is evidenced although the error is low.

INTRODUCTION. — La succession depuis 1986 d'années à épisodes anormalement secs, est illustrée par les chiffres suivants de la station météorologique de Mirecourt (Vosges), rattachée au réseau STEFECE (I.N.R.A.) :

- moyenne annuelle sur 30 ans : 890 mm avec 320 mm pour la période du 31 mai au 15 août ;
- 1986 : 1 099 mm, avec 146 mm du 31 mai au 15 août (année sèche) ;
- 1987 : 908 mm, avec 354 mm pour la même période estivale (année normale).

Ces épisodes secs influent sur les prairies permanentes en ralentissant la croissance des espèces herbacées [1], nous avons donc recherché une méthode rapide d'appréciation du niveau de sécheresse des couverts et proposé une détermination à partir de données de réflectance spectrale, s'appuyant sur les travaux de Colwell, Pearson, Miller et Tucker ([2], [3], [4]).

Plus qu'une simple constatation d'une différence d'état d'une année à l'autre, c'est l'évaluation du niveau de sécheresse des couverts herbacés qui est recherchée, car il conditionne les ressources prairiales et permettrait ensuite d'évaluer des niveaux de déficit de production.

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES. — (A) *Données de terrain.* — La région étudiée, située en Lorraine a déjà fait l'objet d'une présentation succincte [5], de même que le protocole de mesures : masse de matière fraîche (MV), masse de matière sèche (MS), réflectances spectrales en visées verticales dans les canaux SPOT avec le radiomètre « Cimel » [6].

(B) *Traitement des données.* — On dispose pour les 38 parcelles étudiées de 200 groupes de 5 mesures (multidates, réparties de fin avril à fin septembre en 1986 et 1987, à 10 jours d'intervalle au moins). La saisie des données sur ordinateur est effectuée grâce aux logiciels Excel et Cricket Graph, le logiciel Cartographie 2D étant utilisé pour une partie du traitement statistique et la visualisation de certains résultats (travail réalisé à Mirecourt sur ordinateur Macintosh+).

(C) *Analyse des données.* — Elle consiste en la recherche de relations entre mesures de matière sèche et mesures de réflectance par des régressions simples et polynomiales, et des régressions multiples.

II. RÉSULTATS. — (A) *Choix des descripteurs de l'état hydrique.* — La quantité d'eau par hectare  $Q = MV - MS$  n'est pas un bon descripteur du phénomène étudié. En effet Q peut avoir une valeur élevée pour une prairie où l'herbe est haute, mais en partie

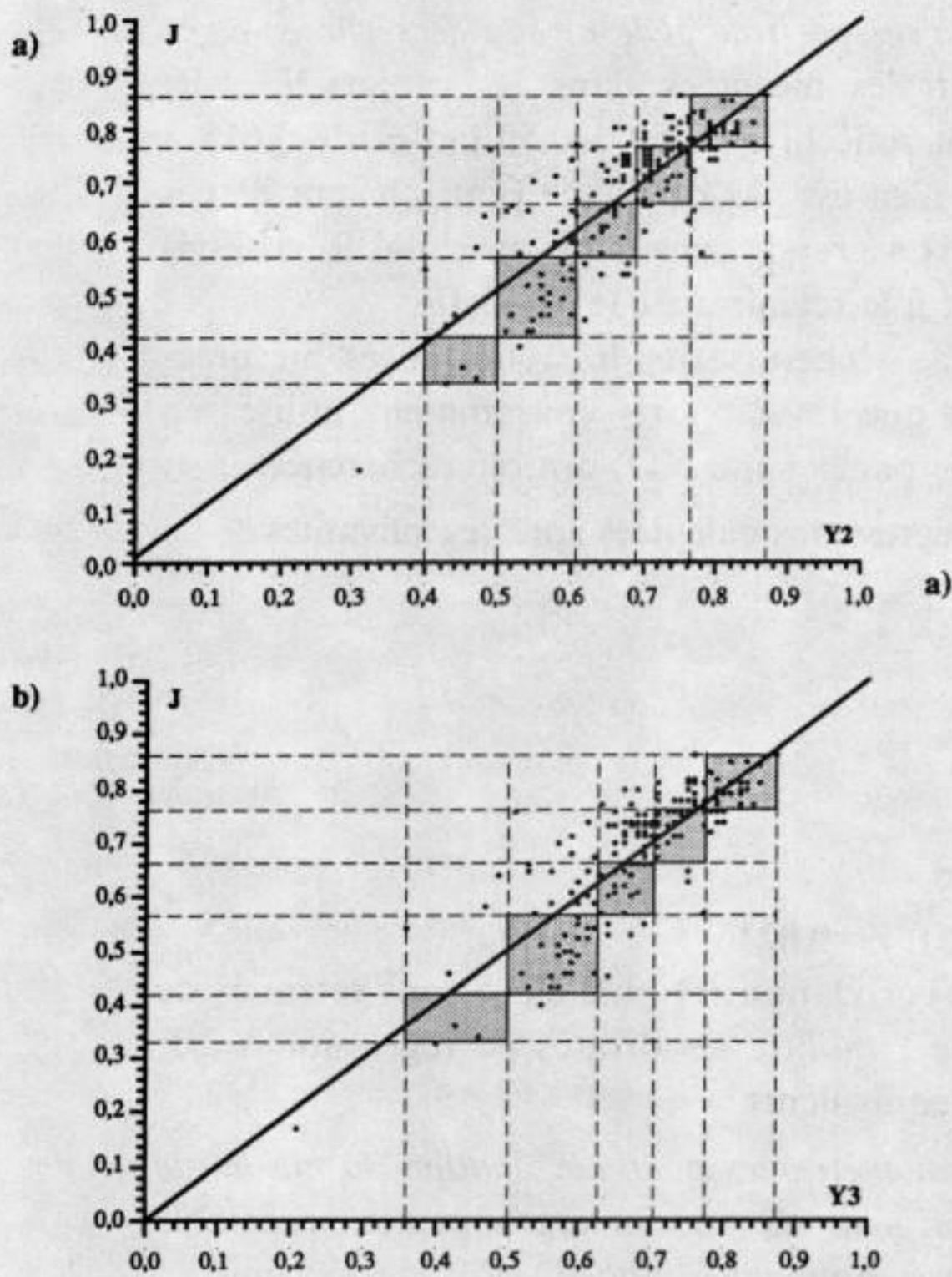


Fig. 1

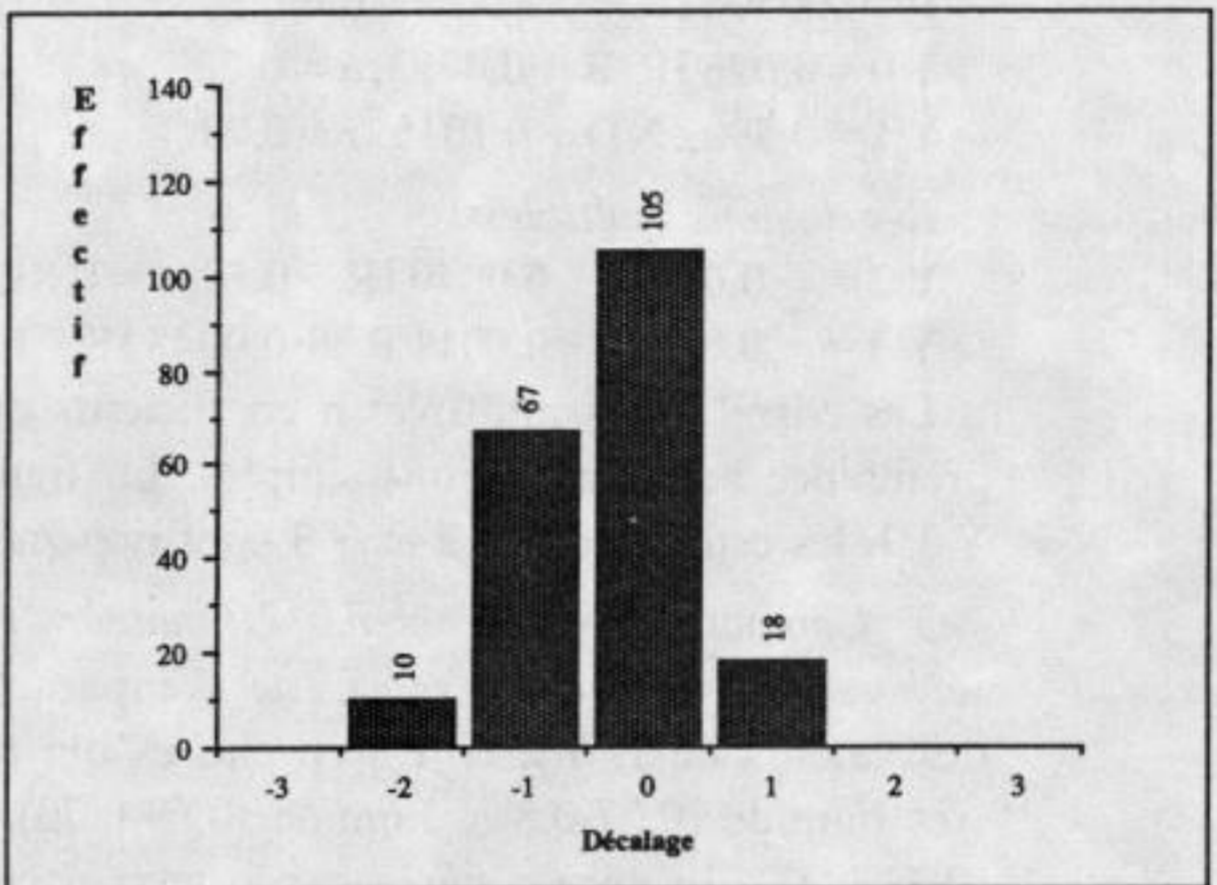
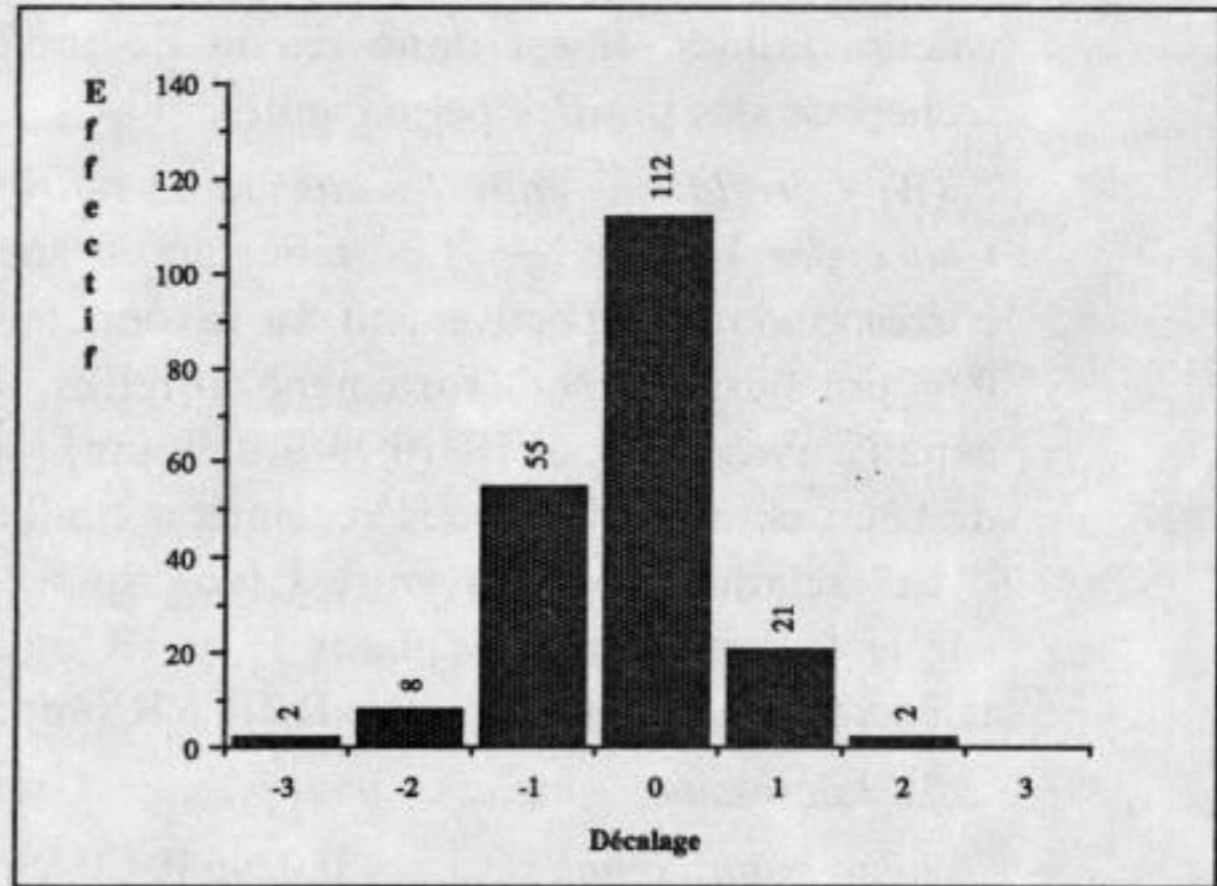


Fig.2

Fig. 1. – Droites de régression des valeurs de Y 2 et de Y 3 par rapport à J (les lignes tiretées indiquent les valeurs limites des classes).

Fig. 1. – Linear regression of Y 2 and Y 3 values on J (the lines show the limits of classes).

Fig. 2. – Comparaison du classement du niveau de sécheresse des prairies selon Y 2 et Y 3 par rapport J.

Fig. 2. – Comparison between dryness of grasslands (Y 2, Y 3) and J.

desséchée (parcelle O9, 21 727 kg/ha, 55 % d'eau, le 25 septembre 1987) et une valeur plus faible pour une prairie où l'herbe est humide mais rase (parcelle C 8, 846,6 kg/ha, 76 % d'eau, le 23 avril 1987).

Le niveau de sécheresse peut s'exprimer par le teneur en eau des végétaux à travers les coefficients H et J :

$H = (MV - MS) / MS$  est utilisé [1] pour l'étude du déficit hydrique,  $J = (MV - MS) / MV$  exprime la teneur en eau rapportée à la matière verte. Il est compris entre 0 et 1. Ces deux coefficients sont reliés par les relations :

$$J = H / (H + 1), \quad H = J / (1 - J)$$

Ils ne sont néanmoins pas équivalents : H est plus sensible aux variations pour les fortes teneurs en eau, tandis que J est un estimateur plus sensible dans des gammes de



valeurs faibles. Il est donc retenu de préférence à H pour déterminer le niveau de sécheresse des prairies permanentes.

(B) *Corrélations entre les valeurs de réflectance spectrale et le niveau de sécheresse. — Choix des canaux.* — Les réflectances spectrales mesurées dans les canaux V et R, correspondant respectivement au rayonnement réfléchi de 0,50 à 0,59  $\mu\text{m}$  et de 0,615 à 0,68  $\mu\text{m}$  (visible), sont fortement corrélées, il n'en est pas de même pour chacun de ces canaux avec le canal IR (0,79 à 0,89  $\mu\text{m}$ ) [4]. La grande sensibilité du canal R vis-à-vis de l'état chlorophyllien des végétaux a conduit à le retenir avec le canal IR.

Les relations existant entre J (descripteur de sécheresse) et les réflectances mesurées sur le terrain dans les canaux R et IR ainsi que les rapports couramment utilisés en télédétection [4] IR/R et IR - R/IR + R (appelé par la suite ND) ont été recherchées.

2. *Régressions simples et multiples.* — Les régressions calculées sont les suivantes :

*Régressions simples :*  $J = -0,0296 R + 0,896$ ,  $r = 0,61$ .

$J = 0,00596 IR + 0,378$ ,  $r = 0,69$ .

$Y_0 = 0,026 IR/R + 0,4783$ ,  $r = 0,70$ .

$Y_1 = 0,7902 ND + 0,1015$ ,  $r = 0,78$ .

*Régressions multiples :*

$Y_2 = -0,022 R + 0,0049 IR + 0,59$ ,  $r = 0,8137$ .

$Y_3 = -0,001 R - 0,0011 R^2 + 0,0048 IR + 0,51$ ,  $r = 0,8213$ .

Les corrélations multiples à coefficients de corrélation ( $r$ ) plus élevés sont retenues de préférence aux corrélations simples. La figure 1 montre les droites de régression  $Y_2/J$ ,  $Y_3/J$ , les estimateurs  $Y_2$  et  $Y_3$  sont presque équivalents.

3. *Comparaison et choix des estimateurs radiométriques pour l'évaluation du niveau de sécheresse des parcelles.* — Cette comparaison s'appuie sur un regroupement préalable des valeurs de J,  $Y_2$  et  $Y_3$  en classes qui correspondent à cinq niveaux de sécheresse : très humide (0,77-0,86), humide (0,69-0,76), normal (0,57-0,68), sec (0,43-0,56), très sec (0,33-0,42). Ils sont repérés sur le terrain en fonction de la physiologie des prairies et des stades phénologiques des espèces. Les valeurs sont regroupées en classes les plus homogènes possibles grâce à méthode de Jenks [7] : la somme des variances calculées à l'intérieur de chaque classe doit être minimale. La comparaison des classements des parcelles selon  $Y_2$  et  $Y_3$  par rapport à J a été effectuée.

La figure 2 donne les histogrammes des nombres de parcelles classées de la même façon (décalage 0), situées à plus ou moins une (-1, +1), deux (-2, +2), trois (-3, +3) classes par  $Y_2$  et  $Y_3$ , les classes établies avec J étant prises comme références.

$Y_2$  et  $Y_3$  classent les parcelles à peu près de la même façon :  $Y_2$ , 56 % classe (0) et 94 % intervalle (-1, +1),  $Y_3$ , 52,5 % classe (0), 95 % intervalle (-1, +1).  $Y_2$  et  $Y_3$  ont tous deux une tendance à la sous-estimation du niveau de sécheresse (effectif classe -1 > effectif classe +1), mais plus marquée pour  $Y_3$ . Nous retenons donc  $Y_2$  comme estimateur pour l'évaluation du niveau de sécheresse.

III. APPLICATION A D'AUTRES DONNÉES ET CONCLUSION. — Pour estimer les possibilités d'utilisation des valeurs de réflectance pour la détermination du niveau de sécheresse des prairies permanentes dans d'autres régions herbagères, nous avons appliqué l'estimateur  $Y_2$  aux valeurs de réflectance acquises sur 38 parcelles dans le Pays d'Auge (Calvados) du 9 au 14 août 1990. La mesure de la teneur en eau de l'herbe par méthode de la coupe et double pesée n'étant pas possible, elle a été estimée sur le terrain à partir de la physiologie des prairies et des stades phénologiques des espèces. Les conditions

de sécheresse importante à cette date, ont fait retenir quatre classes : humide, normal, sec et très sec.

Les valeurs de Y2, calculées à partir des valeurs de réflectance mesurées sur le terrain, ont été regroupées dans les mêmes classes de niveau de sécheresse que celles déterminées à partir des valeurs de Lorraine. La comparaison des répartitions dans les diverses classes (Y2 et J) montre 76 % de prairies bien classées. On constate pour les 24 % restants une tendance à la sous-estimation du niveau de sécheresse dans les valeurs faibles et au contraire une surestimation pour les valeurs fortes.

De précédents travaux [8] montrent que pour des biomasses herbacées sèches à très sèches ( $J < 0,56$ ) les teneurs en chlorophylle sont très faibles. Dans ce cas les valeurs de réflectance dans les bandes R et IR sont sensibles uniquement à la teneur en eau, quelle que soit la quantité de biomasse. Cela justifie l'emploi des canaux R et IR pour une estimation du niveau de sécheresse dans le cas d'une sécheresse importante. Les canaux 5 et 7 du moyen infrarouge (1,55-1,75  $\mu\text{m}$  et 2,08-2,35  $\mu\text{m}$ ) seraient sensibles au contenu en eau. Une première étude de données TM sur la Lorraine correspondant aux mesures de terrain de juin 1986 montre que le canal 7 serait, dans nos situations, mieux corrélé à J ( $r = -0,53$ ). Il faut maintenant pouvoir le vérifier sur des données de radiométrie de terrain effectuées simultanément à des prélèvements de biomasse. La sortie fin 1991 d'un radiomètre de terrain possédant les deux bandes spectrales du moyen infrarouge nous permettra de vérifier ce qu'il en est exactement.

Note remise le 4 février 1991, acceptée après révision le 10 juillet 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. HELLER, R. ESNAULT et C. LANCE, *Physiologie Végétale. 2 Développement*, Masson, Paris, 1990, 266 p.
- [2] J. E. COLWELL, Bidirectional spectral reflectance of grass canopies for determination of above ground standing biomass, *Ph. D. Thesis*, Univ. Michigan, University microfilm, 693, 1973, 75-15, 144 p.
- [3] R. L. PEARSON et L. D. MILLER, Remote mapping of standing crop biomass for estimation of the productivity of the shortgrass prairie, *8th International Symposium on Remote Sensing of Environment*, Univ. of Michigan, Ann Arbor, 1972, p. 1357-1381.
- [4] C. J. TUCKER, Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation, *Remote Sen. Environ.*, 8, 1979, p. 127-150.
- [5] C. M. GIRARD et M. BENOIT, Méthode de cartographie des prairies permanentes : application à la Lorraine sur des données SPOT, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 310, série III, 1990, p. 461-464.
- [6] M. BENOIT, C. M. GIRARD et E. DE VAUBERNIER, Comparaison du comportement spectral de prairies permanentes en Lorraine avec leur type d'utilisation, *Agronomie*, 8, 1988, p. 265-272.
- [7] Anonyme, Notice d'utilisation du logiciel cartographie 2D, *Argos Informatique*, 1988.
- [8] C. M. GIRARD, Caractérisation des prairies permanentes par leur physionomie saisonnière et leur comportement spectral : application à l'évaluation de la biomasse, *Acta Oecologica/Oecologia Plantarum*, 8, 1987, p. 354-356.

M. B. : I.N.R.A.-S.A.D., Domaine du Joly, B.P. n° 35, 88501 Mirecourt;

J.-F. T. : Lycée agricole et forestier, 88500 Mirecourt;

C. M. G. : I.N.A.P.G., Géobotanique, 78850 Thiverval-Grignon.



## Diversité et infidélité relative des images internes de l'antigène de groupe A révélées par l'analyse par IEF

Hervé CRESPEAU, Carol ALLIOT, Jean-M. FINE et Daniel ROCHU

**Résumé** — La diversité de la réponse anti-idiotypique polyclonale (Ab2) contre un anti-A murin monoclonal (Ab1) a été étudiée sur deux populations, une éluée d'une colonne d'anti-A polyclonal humain, l'autre éluée ensuite d'une colonne d'Ab1. La spécificité et la composition clonotypique de ces deux populations ont été analysées après fractionnement par focalisation isoélectrique (IEF), suivi d'une immunodétection par plusieurs anticorps monoclonaux anti-ABH. La première population, constituée d'Ab2 $\beta$ , réagissait avec la plupart des monoclonaux murins anti-ABH, ainsi qu'avec quatre monoclonaux humains anti-A. Par contre, la seconde ne contenait que les anti-idiotypes « vrais » contre l'Ab1. De plus, dans la première population, les images internes mimaient soit l'antigène A, soit l'antigène H, soit encore des épitopes communs aux deux antigènes. Cette étude démontre la pluralité des anticorps porteurs d'images internes, dont certains expriment des idiotopes mimant complètement le déterminant A, et d'autres des images partielles, ou même infidèles. Ces résultats montrent que dans cette cascade idiotypique, il existe une dégénérescence de la spécificité antigénique initiale, dont les conséquences sont discutées.

### Diversity and relative unfaithfulness of internal images of the group A determinant as evidenced by IEF analysis

**Abstract** — The diversity of a polyclonal anti-idiotypic response (Ab2) to a murine monoclonal anti-A (Ab1) was investigated after purification of two Ab2 populations. One was eluted from human polyclonal anti-A column and the other from Ab1. Analysis of the Ab specificity, as well as screening of the clonotypic distribution, were achieved after splitting Ab by IEF; this was followed by immunoblotting and probing with various anti-ABH mAb. The first population reacted with almost all the murine anti-ABH mAb, as well as with four human anti-A mAb, and consequently consisted of Ab2 $\beta$ . The second was composed of "true" Ab2 directed against Ab1. In the first population internal images mimicked either A Ag, or H Ag, or some epitopes common to both. This study demonstrates the plurality of internal images-bearing Ig molecules, some mimicking completely, and some only partially or even unfaithfully the nominal A determinant. The analysis of this idiotypic cascade proves the existence of a degeneracy of the initial restricted antigenic specificity. The consequences of such a process are discussed.

**Abridged English Version** — Based on the network theory of Jerne [1], internal image-bearing anti-idiotypic antibodies against a variety of protein ligands were developed. Some of these Ab mimicked antigens (Ag) both structurally and functionally. As known, the determinants of the ABO blood group system are oligosaccharides, composed of L-fucose, D-galactose and D-N-acetylgalactosamine ([2], [3]). It should be noted that these oligosaccharides were recently introduced as cancer-associated Ag [4].

We recently developed [5] a linear immune cascade (Ag  $\rightarrow$  Ab1  $\rightarrow$  Ab2  $\rightarrow$  Ab3) in which the polyclonal Ab2 against a murine monoclonal anti-A antibody exhibited the expected properties of internal image termed Ab2 $\beta$  [6]. These results evidenced molecular and biological mimicry of protein-free carbohydrate epitopes (oligosaccharides) of ABH Ag. We report here the demonstration of a diversity in the Ab2 $\beta$  population, as well as with a drift in the transfer of the epitopic message; the latter occurs through the mimicry by inaccurate internal images of oligosaccharidic epitopes.

**RESULTS.** — A polyclonal Ab2 to a murine anti-A mAb (Ab1 61) was obtained in rabbit 865. The internal image-bearing Ab2 population (865-h), was isolated by affinity chromatography on a column of purified human polyclonal anti-A Ab. The remaining Ab2 population (865-61), was purified on Ab1 and IgM Kappa columns. The reactivities of both Ab2 sets

Note présentée par Marcel BESSIS.

(865-h and 865-61), were analyzed by a sensitive double-diffusion microassay, towards a panel of 40 anti-ABH mAb (*Fig. 1*). The 865-h set reacted with four human anti-A mAb, while 865-61 did not; this indicates that 865-h set was composed of Ab2 $\beta$  only, displaying internal images of A antigen epitopes. In addition, this set reacted with 18 of 19 Anti-A, and with 4 of 6 anti-A,B mAb from different mice strains as well as human. Surprisingly, 6 of 7 anti-B and 7 of 8 anti-H mAb reacted also with the 865-h set, indicating that images did not mimic the initial A determinant exclusively. A clonotype study in Ab2 populations was achieved using Western-blot analysis after isoelectric focusing (IEF). Probing of the 865-h set, either by a human anti-A mAb, or by a murine anti-H mAb, demonstrated several kinds of internal images consequently borne by distinct Ab2 clones (*Fig. 2*). Some mimicked the A antigen, some the H antigen, and some epitopes borne by both antigens.

DISCUSSION. — As we described previously [5], the xenogenic polyclonal Ab2 response was characterized by the presence of Ab2 $\beta$  mimicking oligosaccharidic epitopes. It should be noted that the internal images-bearing set (Ab2 $\beta$ ) was characterized by positive reactions with almost all murine anti-ABH mAb, as well as with all human anti-A mAb. A more refined screening of Ab2 was achieved by Western-blot analysis, after splitting of clones by IEF. This shows the plurality and diversity of internal images of ABH epitopes. Nonetheless, the existence of partial, or even unfaithful, images was demonstrated. This is not surprising, since A Ag and B Ag are due to glycosyltransferases converting the precursor structure (the H antigen) by the addition of either N-acetylgalactosamine or galactose, respectively. It follows that the mimicry of H epitope could be considered as a result of a partial transmission of physical properties of epitope/paratope (in Ab2 against an anti-A mAb). This suggests a possibility of using polyclonal inaccurate internal images for vaccination against certain viruses. It is worth noting that the human immunodeficiency virus (HIV), exhibits extensive epitopic drift.

---

INTRODUCTION. — Les antigènes du système ABO sont également présents sur des cellules autres que les hématies et à ce titre considérés comme des antigènes histo-sanguins [7]. Les structures chimiques impliquées dans les déterminants A, B et H ont fait l'objet de nombreuses études ([2], [3]). Il s'agit d'oligosides constitués de *L*-fucose, de *D*-galactose et de *D*-N-acétylgalactosamine. Il est important de noter que des antigènes glycosidiques sont associés à certains cancers [4], et de ce fait, font actuellement l'objet d'un intérêt renouvelé.

La théorie du réseau idiotypique de Jerne [1] a été appliquée avec succès à l'étude de divers systèmes biologiques; en particulier, des anticorps anti-idiotypiques ont été préparés contre des ligands essentiellement protéiques. Certains d'entre eux se sont révélés capables de mimer structurellement et fonctionnellement les antigènes correspondants.

Récemment, nous avons pu développer une cascade immune linéaire (Ag  $\rightarrow$  Ab1  $\rightarrow$  Ab2  $\rightarrow$  Ab3), et montrer ainsi qu'un Ab2 polyclonal, induit chez le lapin contre un Ab1 monoclonal murin de spécificité anti-A, mimait des épitopes du système ABO [5]. Ces Ab2 de type  $\beta$  (selon la terminologie adoptée [6]), possédaient les propriétés requises pour satisfaire à la définition d'anticorps porteurs d'images internes, c'est-à-dire : (1) capacité de réagir avec des anti-A de différentes espèces; (2) capacité d'inhiber l'hémagglutination d'hématies A humaines par l'Ab1 anti-A; (3) capacité d'induire une réponse immune Ab3 de spécificité comparable à celle de l'Ab1, c'est-à-dire capable d'agglutiner non seulement des hématies A, mais aussi des hématies B et H. Ces résultats

ont démontré que des régions variables d'immunoglobulines peuvent mimer des épitopes ABH, qui sont de nature exclusivement glucidique.

Ce travail concerne en premier lieu la complexité de la réponse polyclonale anti-idiotypique, nous nous sommes donc penché plus particulièrement sur la diversité de la population Ab2 $\beta$ . Celle-ci ayant induit une réponse Ab3 de spécificité moins restreinte que celle de l'Ab1 [5], il nous a semblé utile de rechercher dans quelle mesure une faille dans le transfert des informations épitopiques était liée à l'hétérogénéité des images internes. Dans ce but, nous avons disséqué les Ab2 en deux populations distinctes, l'une constituée des Ab2 porteurs d'images internes, l'autre des Ab2 dirigés contre l'idiotype de l'Ab1. Des spectrotypes d'anticorps de chacune de ces populations ont été obtenus par focalisation isoélectrique. Leur composition clonotypique, ainsi que leurs capacités de liaison, ont été analysées par immunodétection après transfert vis-à-vis de certains anticorps anti-ABH. Cette approche a permis d'examiner la diversité des images internes ainsi révélées. Enfin, le problème du mimétisme moléculaire « vrai » et complet d'épitopes oligosidiques est discuté.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — L'Ab1 anti-A 61, qui est un anticorps monoclonal IgM Kappa obtenu chez une souris Biozzi immunisée par des hématies humaines A1, a été purifié par affinité [5]. D'autre part, un anticorps anti-idiotypique (Ab2) xénogénique polyclonal a été préparé chez un lapin (865) contre l'Ab1 61, et séparé en deux populations d'anti-idiotypes par chromatographies d'affinité; des aliquots du sérum Ab2 ont été passés sur des colonnes de Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Suède), sur lesquelles ont été fixés de façon covalente, soit un anticorps polyclonal humain anti-A, soit un anticorps monoclonal murin anti-A Biozzi (l'Ab1 61), soit enfin une IgM Kappa monoclonale murine d'une autre spécificité. Les fractions non adsorbées ont été obtenues par passage de PBS. Les anticorps adsorbés ont été élués par un tampon glycine à pH 2,8. Les caractéristiques des quarante anticorps monoclonaux anti-ABH, d'origine murine ou humaine utilisés dans cette étude, ont été décrites précédemment [5]. Un anticorps polyclonal humain anti-A a été purifié à partir d'un pool de sérums de donneurs, par affinité sur un déterminant A synthétique (Synsorb A, Chembiomed, Edmonton, Alberta). Les concentrations des anticorps ont été déterminées à l'aide d'une méthode d'immunodiffusion radiale modifiée [8]. Les réactivités des sous-populations d'Ab2 ont été analysées par une microméthode sensible de diffusion double [9]. L'analyse par focalisation isoélectrique (IEF) des populations d'Ab2 a été réalisée en gel d'agarose (FMC, Rocklands, ME), dans la zone de pH entre 3 et 10. Après IEF, les protéines ont été transférées sur des membranes de PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, MA), bloquées par un tampon Tris salin contenant 6% de gélatine de poisson et 0,05% de Tween 20. Les membranes ont été incubées d'abord avec différents anticorps monoclonaux anti-ABH à 0,5  $\mu$ g/ml, et ensuite avec les antiglobulines spécifiques pour l'espèce (homme, souris) et la classe (IgG, IgM), conjuguées à la phosphatase alcaline (dilutions au 1/500). Les bandes ont été révélées par le 5-bromo-4-chloro-indoxyl phosphate et le Nitro-Blue Tetrazolium.

**RÉSULTATS.** — *Séparation et identification de deux populations d'Ab2.* — A partir du sérum du lapin 865 nous avons purifié par chromatographie d'affinité séquentielle deux populations d'Ab2. La première, désignée 865-h, a été isolée sur une colonne d'anti-A polyclonal humain; la seconde, désignée 865-61, a été isolée sur une colonne d'Ab1 à partir de la fraction non adsorbée sur l'anti-A humain. Les réactivités de ces deux

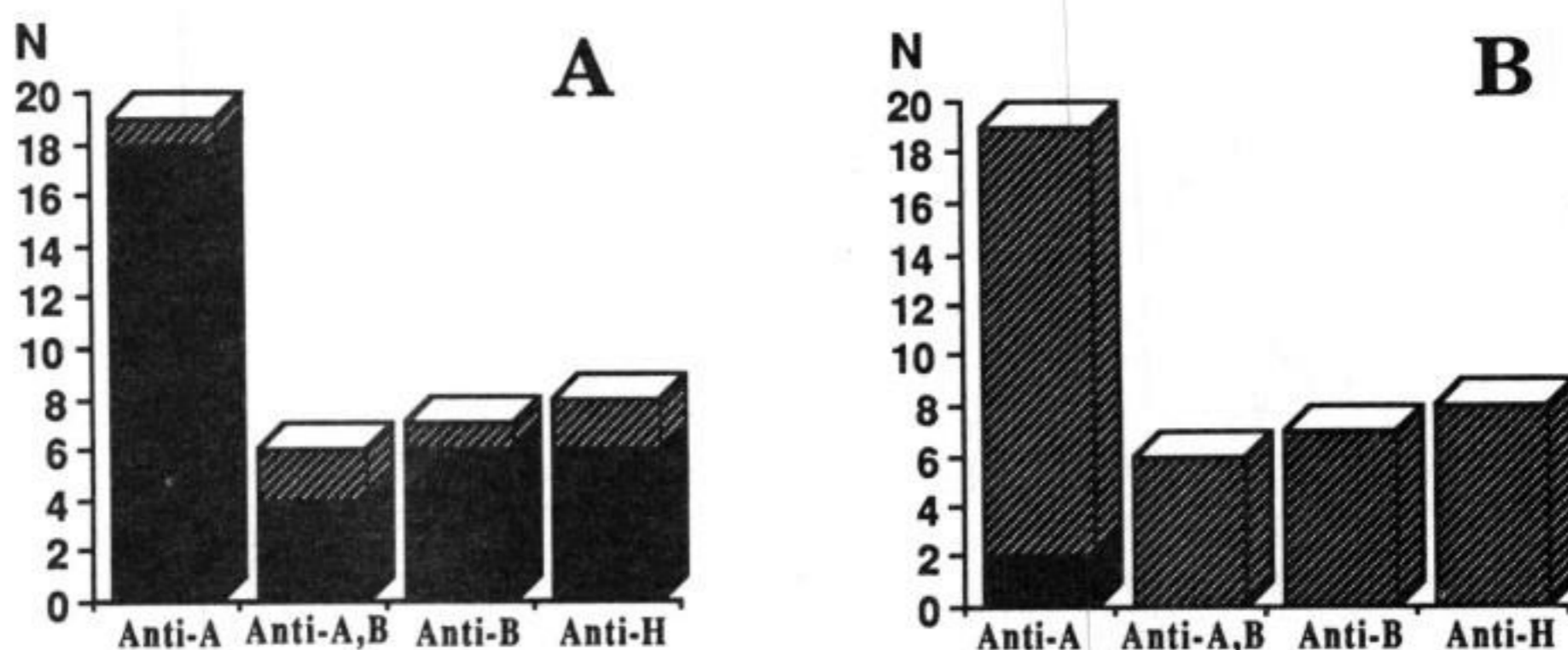


Fig. 1. — Réactivité des populations d'Ab2-865 vis-à-vis d'anticorps monoclonaux anti-ABH, détectée par immunoprécipitation sensible : (A) population 865-h; (B) population 865-61. Les réactions positives sont en noir, les négatives en grisé.

Fig. 1. — Reactivity of Ab2-865 populations against anti-ABH monoclonal antibodies, analyzed by sensitive immunoprecipitation assay: (A) population 865-h; (B) population 865-61. Positive reactions are black, negative are hatched.

populations vis-à-vis de 40 anticorps monoclonaux anti-ABH, analysées par immunoprécipitation, sont exposées dans la figure 1. Purifiée par affinité sur un anti-A humain, la population 865-h devrait *a priori* être constituée des Ab2 de type  $\beta$ , autrement dit porteurs de l'image interne de l'antigène A. En effet, cette population réagit pratiquement avec tous les anti-A, ainsi qu'avec la plupart des anti-A,B, anti-B et anti-H (fig. 1 A). Ces anticorps monoclonaux anti-ABH provenaient d'une part d'hybridomes développés dans des lignées murines différentes, d'autre part d'immortalisation de lymphocytes humains d'individus différents. Ces résultats indiquent que les images ne miment ni strictement ni exclusivement le déterminant A initial. De plus, seule la fraction 865-h montre des réactions positives vis-à-vis des anti-A d'origine humaine; ceci confirme la localisation des Ab2 $\beta$  dans cette fraction. Par contre, des surnageants témoins n'appartenant pas au système ABO, n'ont donné aucune réaction positive. Quant à la population 865-61, elle ne réagit qu'avec deux anti-A (fig. 1B) issus de la même fusion cellulaire que l'Ab1-61.

*Analyse clonotypique des deux populations anti-idiotypiques (Ab2).* — Les profils de focalisation isoélectrique des Ab2 dans les populations 865-h et 865-61 sont complexes, hétérogènes, mais néanmoins reproductibles. Dans le spectrotype de la population 865-h (fig. 2 A), certaines bandes sont détectées uniquement par un anti-A monoclonal humain (6W2), et correspondent à des clones d'Ab2 $\beta$  exprimant des images de l'antigène A. D'autres bandes sont détectées uniquement par un anti-H monoclonal murin Biozzi (517). Ceci témoigne de la présence de clones d'Ab2 $\beta$  porteurs d'images mimant l'antigène H. Enfin, certaines bandes sont révélées par les deux anticorps et correspondent ainsi à des clones d'Ab2 $\beta$  portant des images d'épitopes communs aux déterminants A et H. L'analyse de la population 865-61 montre des spectrotypes identiques après détection soit par l'Ab1 soit par l'anti-H 517 (fig. 2 B). Ceci révèle l'existence de clones d'Ab2 suscités contre les idiotopes « privés » d'anticorps de classe IgM et de spécificité anti-ABH produits par des souris de la lignée Biozzi.

**DISCUSSION.** — Un certain nombre de publications concernent l'obtention d'images internes d'antigènes glycoprotéiques ([10], [11]). Récemment, la possibilité de produire un

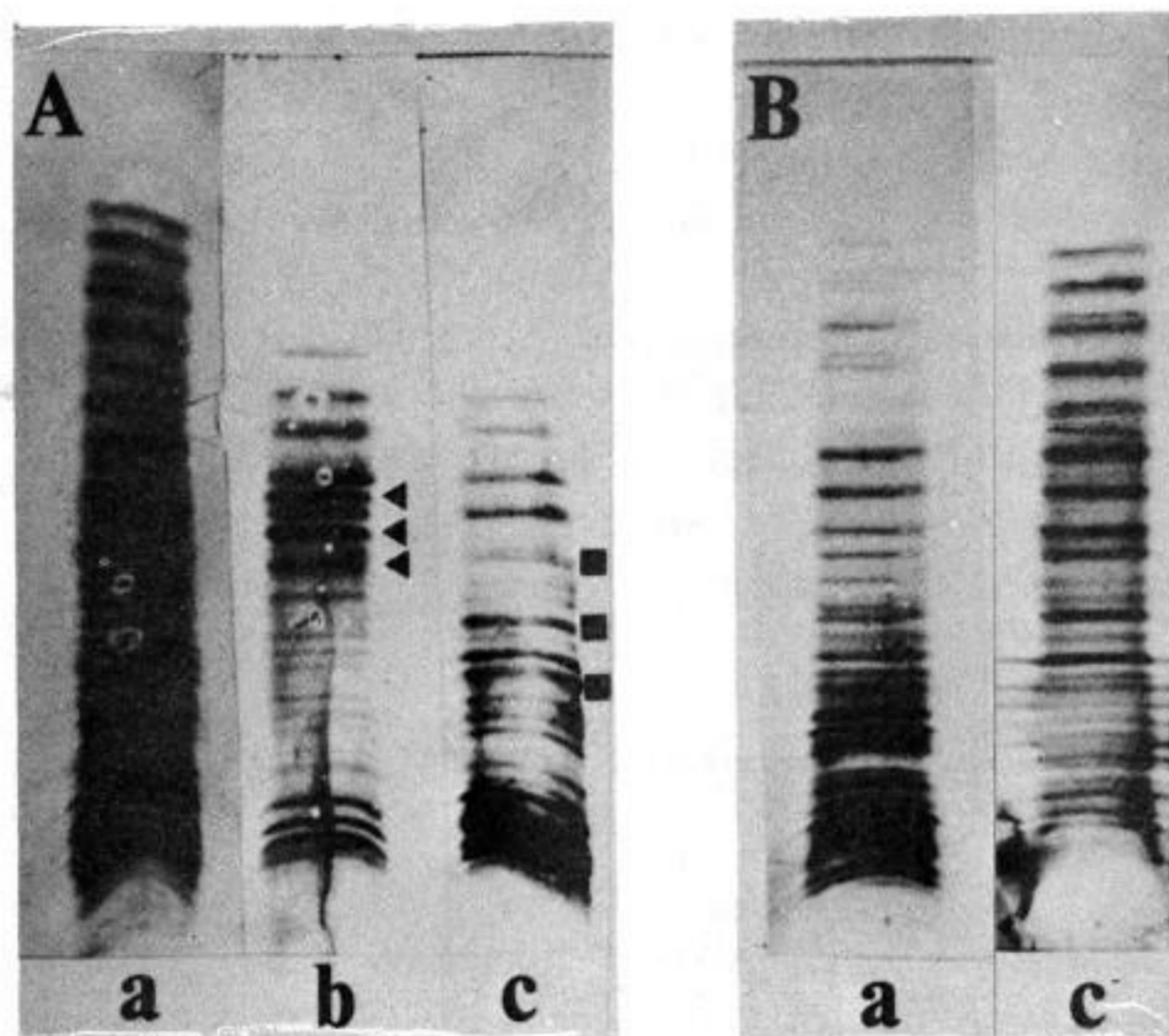


Fig. 2. — Analyse clonotypique des populations d'Ab2-865 par Western Blot après IEF. (A) population 865-h; (B) population 865-61. Ont été éprouvés : (a) l'anticorps monoclonal murin anti-A 61 (Ab1); (b) l'anticorps monoclonal humain anti-A 6W2; (c) l'anticorps monoclonal murin anti-H 517. Les symboles indiquent des clones portant des images internes de l'antigène A (▼), ou de l'antigène H (■).

Fig. 2. — Clonotype analysis of Ab2-865 populations by Western Blot after IEF. (A) population 865-h; (B) population 865-61, probed by: (a) the murine monoclonal antibody anti-A 61 (Ab1); (b) the human monoclonal antibody anti-A 6W2; (c) the murine monoclonal antibody anti-H 517. Symbols indicate clones bearing internal images of A (▼) or H (■) antigens.

anticorps anti-ABH, donc strictement anti-oligoside, par injection d'anti-idiotypes porteurs d'images internes a été clairement démontrée [5]. La réponse Ab3 ainsi obtenue exprime une capacité d'hémagglutination qui déborde la spécificité A. Ceci nous a amené à considérer l'hétérogénéité des Ab2 $\beta$  dirigés contre le site de reconnaissance (ou paratope) de l'Ab 1 anti-A. Il faut noter qu'une hétérogénéité des images internes d'antigènes de nature protéique a été également décrite ([12], [13]). L'hypothèse d'un mimétisme moléculaire à deux niveaux, mettant en jeu des images de déterminants protéiques soit natifs soit résiduels, a été avancée [14].

Dans le présent travail, nous démontrons la diversité d'expression du mimétisme moléculaire d'épitopes oligosidiques par le processus de l'image interne, au sein des anticorps anti-idiotypiques xénogéniques polyclonaux dirigés contre un anti-A monoclonal. L'étude de la population 865-h permet d'identifier celle-ci aux Ab2 de type  $\beta$ . Il est important d'insister sur le fait que l'analyse par Western-blot des spectrotypes d'anticorps contenus dans cette population met en évidence des clones mimant soit le déterminant A, soit le déterminant H, soit des épitopes communs à la fois à A et à H. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les antigènes A et B résultent de l'antigène H, et ceci par l'addition soit de N-acétylgalactosamine soit de galactose, par des glycosyltransférases. Ainsi, les similitudes structurales présentées par les déterminants A, B et H pourraient peut-être expliquer la relative infidélité des images internes. Une autre hypothèse pourrait être envisagée, notamment la difficulté à reproduire fidèlement des épitopes glucidiques à l'aide des aminoacides des boucles hypervariables des anti-idiotypes. Quoiqu'il en soit,



une dérive des caractères structuraux de l'antigène initial est mise en évidence par la présence concomitante d'images multiples, dont certaines sont soit incomplètes, soit infidèles.

L'existence d'une diversité et d'une fidélité relative des images internes produites lors d'une réponse anti-idiotypique polyclonale, suggère la possibilité d'utiliser ces propriétés en vue de développer des vaccins anti-viraux. A ce sujet, on peut rappeler que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), présente une variabilité épitopique considérable [15] au niveau des boucles hypervariables de la glycoprotéine 120.

Note remise le 18 juin 1991, acceptée le 12 août 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] N. K. JERNE, *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 125C, 1974, p. 373-389.
- [2] W. T. J. MORGAN et W. M. WATKINS, *Br. J. Exp. Pathol.*, 34, 1953, p. 94-103.
- [3] E. A. KABAT, Academic Press, New York, 1956.
- [4] S. HAKOMORI, *Cancer Res.*, 45, 1985, p. 2405-2414.
- [5] D. ROCHU, H. CRESPEAU, A. FINE, P. GANE, P. ROUGER, C. SALMON et J.-M. FINE, *Res. Immunol.*, 141, 1990, p. 373-387.
- [6] N. K. JERNE, J. ROLAND et P.-A. CAZENAVE, *E.M.B.O. J.*, 1, 1982, p. 243-247.
- [7] H. CLAUSEN et S. HAKOMORI, *Vox Sang. (Basel)*, 56, 1989, p. 1-20.
- [8] D. ROCHU, H. CRESPEAU, A. FINE, M. MARNEUX et J.-M. FINE, *Rev. Franç. Transfus. Hémobiol.*, 32, 1989, p. 277-290.
- [9] D. ROCHU, H. CRESPEAU, A. FINE et J.-M. FINE, *J. Immunol. Methods*, 118, 1989, p. 67-71.
- [10] J. Y. CESBRON, M. HAYAKI, M. JOSEPH, C. LUTSCH, C. GRZYCH et J. M. CAPRON, *J. Immunol.*, 141, 1988, p. 279-285.
- [11] L. J. RUBINSTEIN, B. GOLDBERG, J. HERNIAUX, K. E. STEIN et C. A. BONA, *J. Exp. Med.*, 158, 1983, p. 1129-1144.
- [12] M. BUDISAVLJEVIC, M. GENITEAU-LEGENDRE, B. BAUDOIN, F. PONTILLON, P. J. VERROUST et P. M. RONCO, *J. Immunol.*, 140, 1988, p. 3059-3065.
- [13] Y. M. THANAVALA, S. E. BROWN, C. R. HOWARD, I. M. ROITT et M. D. STEWARD, *J. Exp. Med.*, 164, 1986, p. 227-236.
- [14] W. L. CLEVELAND, D. S. LINTHICUM et N. R. FARID éd., p. 199, Springer-Verlag, New York.
- [15] M. ALIZON, S. WAIN-HOBSON, L. MONTAGNIER et P. SONIGO, *Cell*, 46, 1986, p. 63-74.

Institut national de Transfusion sanguine,  
6, rue Alexandre-Cabanel, 75739 Paris Cedex 15.

## Mise en évidence d'une pyrophosphatase associée au tonoplaste dans le latex d'*Hevea brasiliensis*

Jean-Claude PRÉVÔT SISWANTO, Anne CLÉMENT et Jean-Louis JACOB

**Résumé** — Une pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) associée aux membranes des lutoïdes, particules vacuolysomales du latex d'*Hevea brasiliensis* est mise en évidence. Son fonctionnement nécessite du  $Mg^{2+}$ . Son optimum de pH, très large, se situe vers pH 7,7. Elle est inhibée par le NaF mais est insensible au molybdate et au nitrate; ces résultats permettent de la distinguer de la phosphatase lutoïdique qui reste partiellement adsorbée sur le tonoplaste et de l'ATPase liée à ce même tonoplaste. Sa très forte affinité pour son substrat, et son activation par le  $K^+$  la différencie de la pyrophosphatase soluble cytosolique du latex précédemment décrite. Son rôle physiologique au sein du latex est évoqué.

### Evidence for a pyrophosphatase on the tonoplast of *Hevea brasiliensis* latex

**Abstract** — A pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) was evidenced on the membrane of lutoïds, vacuolysosomal particles of *Hevea brasiliensis* latex. Its functioning is  $Mg^{2+}$  dependent. Its broad optimum pH is at about 7.7. It is inhibited by NaF but it is not sensitive to molybdate and nitrate making it possible to distinguish it clearly from lutoïdic Pase, which is adsorbed to varying extents by the tonoplast, and the ATPase linked to this tonoplast. It differs from latex cytosol PPase already described, by its  $K^+$  activation and its substrate affinity is much stronger. Its physiological role is evoked.

**Abridged English Version** — *Hevea brasiliensis* latex is a cytoplasm from laticiferous vessels ([1], [2]). Study of the biochemical mechanisms capable of controlling its renewal between two tappings, and hence rubber production [3], has made it possible to stress the importance of the role played by pyrophosphate (PPi). PPi production is very large since it is released during the fixation by rubber transferase (EC 2.5.1 aa) of each link of isopentenyl pyrophosphate in the *cis*-polyisoprene chain being formed [4] and since the rubber content of latex is very high (90% of dry weight). The accumulation of PPi can slow or even inhibit numerous syntheses in which it is involved ([5], [6]) and possibly that of *cis*-polyisoprene itself. Search for enzymatic systems which are capable of preventing this accumulation led to discovery of the presence of a cytosol pyrophosphatase in latex [7]. It was necessary to know whether another pyrophosphatase could, as for other plants ([8]-[12]), be located on tonoplast (lutoïd membranes), the interface between the vacuolysosomal compartment of latex [13] and the cytosol. Lutoïd tonoplast possesses an ATPase proton pump and, strongly adsorbed, a fraction of the acid phosphatase located in the lutoïd serum ([14], [15]). The present work aims at differentiating on these lutoïd membranes a PPase distinct from the hydrolases which have already been mentioned.

Latex collected on ice by rubber tree tapping was centrifuged ( $30,000 \times g$  for 30 min.). Cytosol serum obtained was collected freeze-dried and stored at  $-30^{\circ}C$ . It was used to purify the cytosol PPase according to the method of Jacob *et al.*, [7]. Lutoïds from the bottom fraction of latex centrifugation were washed twice in tris-MES buffer  $5 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $MgCl_2$   $5 \text{ mmol l}^{-1}$ , mannitol  $0.33 \text{ mol l}^{-1}$ , at pH 7.6, freeze-dried and stored at  $-30^{\circ}C$ . In order to remove the enzymes from lutoïdic and cytosolic sera, the freeze-dried material was resuspended (10 mg per millilitre) in a buffer BTP-histidine

Note présentée par Alexis MOYSE.

25 mmol l<sup>-1</sup>, pH 7.6, MgSO<sub>4</sub> 5 mmol l<sup>-1</sup> and homogenized in Potter apparatus, then centrifuged (39,000 × g for 20 min.). The washing was performed three times. The first washing medium contained 0.02% of Triton X 100.

The ATPase, Pase and PPase activities were measured by the release of Pi measured using Taussky and Shorr's method [16]. Pase activity was also measured using the technique adapted by Pujarnisclé [13]. Before and after incubation, the non-hydrolysed PPI was also determined enzymatically [17] and the proteins were determined by Bradford's method [18].

Table I shows that the lutoid membranes hydrolyse *para*-nitrophenyl-phosphate (PNPP) and PPI. These activities were inhibited by molybdate in the absence of Mg<sup>2+</sup>. They can be attributed to a fraction of intralutoidic acid phosphatase, which is extremely sensitive to this inhibitor [19] and yet adsorbed on the membranes ([14], [15]). The hydrolysis of PNPP is inhibited by molybdate in the presence of Mg<sup>2+</sup> but that of PPI is not. However, previous work [20] has shown that by chelating PPI, Mg<sup>2+</sup> inhibits hydrolysis of the latter through intralutoid acid phosphatase. The activity observed is therefore not caused by this acid phosphatase but by a PPase whose functioning requires Mg<sup>2+</sup>. In the presence of Mg<sup>2+</sup>, the addition of NaF—which has no effect on PNPP hydrolysis or hence on the intralutoid acid Pase—inhibits 75% of PPI hydrolysis. This confirms the presence of a distinct PPase on lutoid membranes.

ATPase is also associated to lutoidic membranes ([15], [21], [22]). Table II shows that the PPase and ATPase activities measured on the membranes are additive, that NaNO<sub>3</sub> inhibits ATPase (result known [21], [23]), but not PPase. In contrast, NaF does not inhibit ATPase [24] but PPase (Table I). These activities are therefore catalysed by two enzymes or two different sites which are specific for their substrates.

If the optimum pH for the functioning of the lutoid membrane PPase is 7.7 (*Fig.*) as for the cytosolic latex PPase [7], the two hydrolases have some different characteristics. Table III shows that as other tonoplast PPase ([9]-[12], [24]), K<sup>+</sup> only activates the PPase of the lutoid membranes and that the affinity of this enzyme for PPI is much stronger than the one of the cytosol PPase.

Given the composition of latex, the PPase activity clearly shown on the lutoid membranes and its characteristics indicate that it probably functions *in situ*. The control of cytosol PPI jointly with the cytosol PPase and a cytosol fructose-6-phosphotransferase ([25], [26]) and the possible proton pump that functions jointly with the tonoplast ATPase [27] mean that the metabolic regulation exerted by the enzyme may be of great importance in the functioning of tapped rubber trees.

---

INTRODUCTION. — Entre deux saignées de l'*Hevea brasiliensis*, la régénération du latex, véritable cytoplasme du système laticifère ([1], [2]) est un facteur limitant de la production de caoutchouc [3]. Les nombreuses études entreprises dans ce domaine [3] ont souligné le rôle du pyrophosphate (PPI) impliqué dans les processus énergétiques du métabolisme. Cette molécule, associée au précurseur immédiat du *cis*-polyisoprène : le pyrophosphate d'isopentényle (IPP), est libérée chaque fois que la transférase assurant la synthèse du caoutchouc (rubber transferase : EC 2.5.1 aa), en fixant une molécule d'IPP, allonge la chaîne du polymère [4]. La très forte teneur en caoutchouc du latex, plus de 90 % de sa matière sèche [3], implique une production importante de PPI. Or, l'accumulation de ce produit est susceptible d'inhiber de nombreuses synthèses dans lesquelles il est impliqué ([5], [6]), dont peut-être, celle du *cis*-polyisoprène lui-même. La nécessité de systèmes

capables d'éviter cette accumulation a conduit à rechercher, au sein du latex d'*Hevea*, l'existence d'hydrolases spécifiques. A cet égard, une pyrophosphatase (PPase) cytosolique soluble a été mise en évidence, purifiée et étudiée [7]. L'existence d'une pyrophosphatase tonoplastique trouvée chez *Beta vulgaris* en 1981 [8] et dont la fonction de pompe à protons a été montrée par la suite chez d'autres plantes ([9]-[12]), a conduit également à rechercher cette enzyme sur la membrane des lutoïdes à l'interface du cytosol et du compartiment vacuolysosomal du latex [13]. On sait que le tonoplaste lutoïdique possède une ATPase pompe à protons [14] et qu'il adsorbe fortement une fraction de la phosphatase acide (Pase) contenue dans le sérum lutoïdique ([14], [15]); le présent travail vise à mettre en évidence sur les membranes lutoïdiques une pyrophosphatase distincte des hydrolases précédemment citées.

**MATÉRIELS ET MÉTHODES.** — Le latex est récolté dans la glace par saignée d'*Hevea* du clone GT 1, en Côte-d'Ivoire. Il est centrifugé à  $30\,000 \times g$  30 mn. Le sérum cytoplasmique (sérum C) qui sert à l'isolement de la pyrophosphatase cytosolique est prélevé et lyophilisé. Le culot de centrifugation, constitué essentiellement de lutoïdes est lavé deux fois en tampon tris-MES  $25\text{ mmol l}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $5\text{ mmol l}^{-1}$ , mannitol  $0,33\text{ mol l}^{-1}$ , pH 7,6 avant d'être lyophilisé. Les lyophilisats peuvent être stockés à  $-30^\circ\text{C}$  avant d'être utilisés. Afin d'éliminer au maximum les enzymes cytosoliques et intralutoïdiques, les lyophilisats de lutoïdes sont repris, à raison de  $10\text{ mg ml}^{-1}$ , dans un tampon BTP-histidine  $25\text{ mmol l}^{-1}$ , pH 7,6,  $\text{MgSO}_4$ ,  $5\text{ mmol l}^{-1}$ , homogénéisés au potter et centrifugés ( $39\,000 \times g$ , 20 mn). Cette opération est répétée trois fois. Lors du premier lavage, 0,02 % de Triton X 100 sont ajoutés au milieu. Chaque activité hydrolytique : phosphatase (Pase), ATPase et PPase, a été mesurée, en fonction de plusieurs temps d'incubation à  $25^\circ\text{C}$ , par dosage du Pi libéré selon la méthode de Taussky et Shorr [16]; l'activité PPase a également été mesurée à l'aide de *para*-nitrophénylphosphate (PNPP) selon la technique adaptée par Pujarnisclé [13] et l'activité PPase à partir des dosages enzymatiques du PPI avant et après incubation [17]. Afin de comparer la PPase associée au tonoplaste et la PPase du sérum cytosolique, cette dernière a été isolée du lyophilisat de sérum C et partiellement purifiée selon la technique de Jacob et coll. [7]. Les teneurs en protéines ont été dosées selon la méthode de Bradford [18].

**RÉSULTATS.** — Le tableau I montre que les membranes des lutoïdes lavées possèdent des activités hydrolysant le PNPP et le PPI.

Les activités qui s'observent en absence de  $\text{Mg}^{2+}$  sont inhibées par le molybdate. Elles peuvent être attribuées à la phosphatase acide intralutoïdique, très sensible à cet inhibiteur [16], et dont une fraction reste fortement adsorbée au niveau des structures tonoplastiques malgré les lavages successifs comme l'ont montré plusieurs auteurs ([14], [15]).

En présence de  $\text{Mg}^{2+}$ , si l'hydrolyse du PNPP est inhibée par le molybdate, celle du PPI ne l'est pas. Or, des travaux antérieurs ont montré que le  $\text{Mg}^{2+}$ , en chélatant le PPI, empêchait l'hydrolyse de ce dernier par la phosphatase acide lutoïdique du latex [20]; il apparaît donc que l'activité observée dans ce cas au niveau des membranes lutoïdiques, n'est pas due à cette hydrolase mais bien à une pyrophosphatase dont le fonctionnement nécessite du  $\text{Mg}^{2+}$ . En effet, en présence de molybdate qui inhibe la phosphatase

TABLEAU I

Comparaison de l'hydrolyse du PPI et du PNPP par une suspension de membranes lutoïdiques lavées, en absence ou en présence de magnésium, de molybdate et de NaF.

*Comparison of PPI and PNPP hydrolysis by washed lutoïdic membranes, with or without magnesium, molybdate and NaF.*

	PPI	PNPP
Substrat seul. . . . .	4,8	7,2
+ Mo. . . . .	0,2	1,5
+ $\text{Mg}^{2+}$ . . . . .	8,3	6,2
+ $\text{Mg}^{2+}$ Mo. . . . .	8,2	1,4
$\text{Mg}^{2+}$ + NaF. . . . .	0,1	6,4
+ $\text{Mg}^{2+}$ + NaF + Mo. . . . .	0,1	1,2

Milieu d'incubation : tampon BTP-histidine  $25\text{ mmol l}^{-1}$ , pH 7,6, PPI  $1\text{ mmol l}^{-1}$ , PNPP  $8\text{ mmol l}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $5\text{ mmol l}^{-1}$ , molybdate d'ammonium  $100\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ , NaF  $1\text{ mmol l}^{-1}$ . Les activités sont exprimées en  $\mu\text{moles de Pi ou de PNP libéré h}^{-1}\text{ mg prot}^{-1}$ .

TABLEAU II

Comparaison des activités PPase et ATPase de la membrane des lutoïdes.  
Influence du nitrate et du NaF.

*Comparison of PPase and ATPase activities on lutoïd membrane.  
Nitrate and NaF influence.*

	Activité PPase ou ATPase	
	$\mu\text{moles Pi}$ libéré $\text{h}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$	$\mu\text{moles PPI}$ hydrolysé $\text{h}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$
PPi. ....	5,9	2,8*
ATP. ....	1,9	
ATP+PPi. ....	7,3 (7,8)	3,6*
PPi+NaNO <sub>3</sub> . ....	5,5	2,8*
ATP+NaNO <sub>3</sub> . ....	0,3	
PPi+ATP+NaNO <sub>3</sub> . ....	6,1 (5,8)	
ATP+NaF. ....	1,8	

Milieu d'incubation : tampon BTP-histidine 25 mmol l<sup>-1</sup>, pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 5 mmol l<sup>-1</sup>, molybdate d'ammonium 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , NaNO<sub>3</sub> 50 mmol l<sup>-1</sup>, NaF 1 mmol l<sup>-1</sup>, ATP et (ou) PPI 1 mmol l<sup>-1</sup>. Entre parenthèses sont indiquées les valeurs calculées par addition des activités PPase et ATPase. \* il faut noter que la quantité de PPI hydrolysé (dosage enzymatique) correspond bien à la moitié de Pi libéré.

TABLEAU III

Comparaison entre la PPase associée aux membranes des lutoïdes :  
influence du K<sup>+</sup>, affinité du K<sup>+</sup>, affinité pour le PPI.

*Comparison between cytosolic PPase and lutoïdic membrane bound PPase:  
K<sup>+</sup> influence and PPI affinity.*

A KCl (mmol l <sup>-1</sup> )	Activités	
	PPase cyto- solique	PPase tonoplastique
0. ....	9,5	2,8
10. ....	9,7	5,0
25. ....	9,6	6,2
50. ....	9,6	6,5

B MgCl <sub>2</sub> (mmol l <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> PPI	
	PPase cyto- solique	PPase tonoplastique
2,5. ....	170	35
10,0. ....	420	55

A : Milieu d'incubation : tampon BTP-histidine 25 mmol l<sup>-1</sup>, pH 7,6, MgSO<sub>4</sub> 5 mmol l<sup>-1</sup>, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, PPI 1 mmol l<sup>-1</sup>, molybdate d'ammonium 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Les activités sont exprimées en  $\mu\text{moles de Pi libéré h}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ .

B : Milieu d'incubation identique au précédent. Les K<sub>m</sub> sont exprimés en  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Concentrations de PPI utilisé entre 15  $\mu\text{mol l}^{-1}$  et 1 mmol l<sup>-1</sup> pour la PPase tonoplastique et entre 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  et 5 mmol l<sup>-1</sup> pour la PPase cytosolique. Les cinétiques obtenues dans ces conditions d'expérience sont de type michaélien.

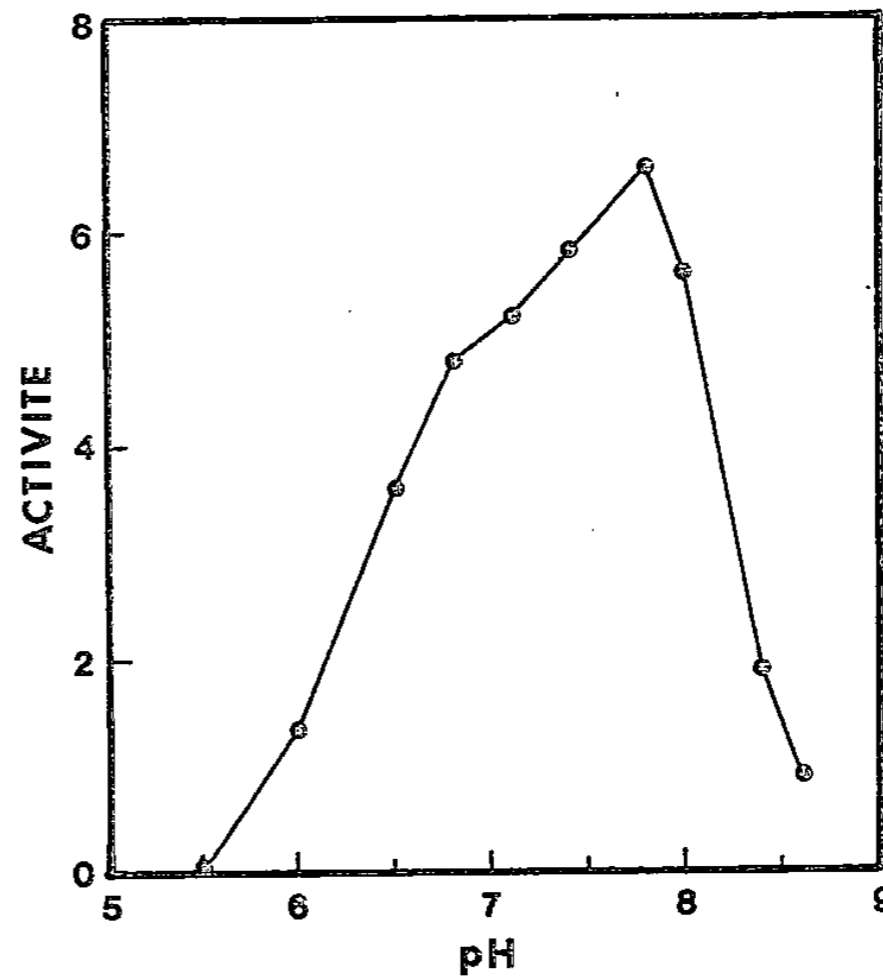
lutoïdique, l'activité PPase passe de 0,2 à 8,2  $\mu\text{moles de Pi libéré h}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$  lorsque l'on ajoute 10 mmol l<sup>-1</sup> de Mg<sup>2+</sup> dans le milieu. Il faut noter que cette activité est linéaire en fonction du temps et proportionnelle à la quantité de protéines participant à la réaction (résultats non montrés).

En présence de Mg<sup>2+</sup> l'addition de NaF n'a pas d'influence sur l'hydrolyse du PNPP, et donc sur la Pase lutoïdique mais elle inhibe à plus de 75 % l'activité d'hydrolyse du PPI; ce résultat confirme l'existence d'une pyrophosphatase distincte sur les membranes lutoïdiques.

Les membranes lutoïdiques possèdent également une activité ATPasique ([15], [21], [22]). En présence de MgCl<sub>2</sub> et de molybdate écartant toute activité phosphatasique lutoïdique, il apparaît (tableau II) que les activités ATPase et PPase mesurées par

Activité de la PPase associée à la membrane lutoïdique du latex en fonction du pH. Milieu d'incubation : tampon tris-maléate  $100 \text{ mmol l}^{-1}$ , PPI  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $5 \text{ mmol l}^{-1}$ , molybdate d'ammonium  $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ . L'activité est exprimée en  $\mu\text{moles Pi libéré h}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ .

Activity of PPase from lutoïdic membrane of *Hevea latex* according to pH. Tris-maleate buffer  $100 \text{ mmol l}^{-1}$ , PPI  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ , ammonium molybdate  $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $5 \text{ mmol l}^{-1}$ . Activity is expressed as  $\mu\text{moles released Pi h}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ .



libération de Pi sont quasi additives. L'addition de  $\text{NaNO}_3$  n'a pas d'effet significatif sur l'activité PPase mais, comme il a été montré par ailleurs ([21], [23]), elle inhibe fortement l'ATPase. L'activité hydrolasique totale, dans le milieu contenant de l'ATP et du PPI, en présence de  $\text{NaNO}_3$ , correspond bien à l'addition des activités mesurées séparément dans les mêmes conditions : celle de la PPase non modifiée et celle de l'ATPase partiellement inhibée. Le  $\text{NaF}$  à  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  n'a pas d'effet sur l'activité ATPase (tableau II) alors qu'il inhibe la PPase (tableau I).

Si la PPase associée à la membrane lutoïdique a un large optimum de pH situé autour de 7,7 (*fig.*), comme la PPase cytosolique [7], quelques paramètres permettent de différencier les deux hydrolases (tableau III). En premier lieu, le  $\text{K}^+$  n'a aucune influence sur l'enzyme cytosolique mais active l'enzyme membranaire. En second lieu, leur affinité pour le PPI est très différente, la constante de Michaelis varie entre  $170$  et  $420 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  pour la PPase cytosolique et entre  $35$  et  $55 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  seulement pour la PPase du tonoplaste.

CONCLUSIONS. — L'existence d'une PPase associée aux membranes lutoïdiques a été mise en évidence. Son fonctionnement nécessite du  $\text{Mg}^{2+}$ , son optimum de pH est alcalin. Son inhibition par le  $\text{NaF}$ , commune à de nombreuses PPases tonoplastiques ([10], [24]), de même que son insensibilité au molybdate et au nitrate permettent de la distinguer de la phosphatase lutoïdique et de l'ATPase tonoplastique. Elle se différencie de son homologue cytosolique, d'une part, par son activation par le  $\text{K}^+$  caractéristique de nombreuses PPases tonoplastiques ([9]-[12], [24]) et d'autre part par son affinité beaucoup plus forte pour le PPI.

Compte tenu de la composition du cytosol du latex il est probable que la PPase associée aux membranes lutoïdiques soit fonctionnelle *in situ*. En effet, les teneurs en PPI, entre  $40$  à  $80 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  [20] sont de l'ordre de grandeur du  $K_m$  de l'enzyme pour ce substrat, et la concentration en  $\text{Mg}^{2+}$  n'est jamais inférieure à  $8 \text{ mmol l}^{-1}$  [3]. La présence d'au moins  $40 \text{ mmol l}^{-1}$  de  $\text{K}^+$  [3] doit assurer l'activation maximale de l'enzyme. Le pH physiologique de ce milieu (6,8-7,3) [3] correspond à une zone où l'activité PPase est proche de son optimum.

Concernant le rôle physiologique de cette PPase tonoplastique, deux hypothèses peuvent être proposées. En premier lieu, du fait de la très importante production de PPi lors de la régénération du latex entre deux saignées, elle peut, en association avec la PPase cytosolique, participer au contrôle des teneurs en PPi dans certaines limites. Ce dernier joue en effet un rôle important dans la régulation glycolytique notamment par l'intermédiaire d'une pyrophosphate : fructose-6-phosphate phosphotransférase (EC 2.7.1.90) présente au sein du latex ([25] [26]). En second lieu, Gidrol travaillant sur des lutoïdes frais a montré, lors de l'étude de l'ATPase tonoplastique pompe à protons du latex, qu'une acidification du sérum intralutoïdique était également obtenue si, à la place de l'ATP, du PPi était ajouté dans le milieu [27]. Il est possible que la PPase associée aux membranes lutoïdiques, comme la PPase tonoplastique d'autres plantes, ait également une fonction vectorielle de pompe à protons ([9]-[12]). Celle-ci s'associerait à celle de l'ATPase tonoplastique déjà étudiée dans le latex ([21], [22], [27]) et, à ce titre, aurait un rôle dans la régulation de l'homéostasie dont l'importance majeure sur les mécanismes liés à la production a été démontrée [3].

Note remise le 13 mai 1991, acceptée après révision le 12 août 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] P. B. DICKENSON, *Proc. Nat. Rubb. Prod. Res. Ass. Jub. Conf.*, Cambridge, 1964, L. MULLINS éd., 1965, p. 52-56.
- [2] C. HEBANT, *Can. J. Bot.*, 59, 1981, p. 974-985.
- [3] J. D'AUZAC, J.-L. JACOB et H. CHRESTIN, *Physiology of Rubber Tree Latex*, C.R.C. Press Inc., Boca Raton, 1989, 470 p.
- [4] F. LYNEN, *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21, 1969, p. 389-406.
- [5] A. KORNBERG, *Horizons in Biochemistry*, K. KASHA et B. PULMAN éd., Acad. Press, 1962, p. 252-287.
- [6] J. AMIR et J. H. CHERRY, *Plant Physiol.*, 49, 1972, p. 893-897.
- [7] J.-L. JACOB, J.-C. PREVOT, A. CLEMENT-VIDAL et J. D'AUZAC, *Plant Physiol. Biochem.*, 27, 1989, p. 355-364.
- [8] R. R. WALKER et R. A. LEIGHT, *Planta*, 153, 1981, p. 150-155.
- [9] P. A. REA et J. POOLE, *Plant Physiol.*, 77, 1985, p. 46-52.
- [10] Y. WANG, R. A. LEIGHT, K. H. KAESTNER et H. SZE, *Plant Physiol.*, 81, 1986, p. 497-502.
- [11] P. J. WHITE, J. MARSHALL et J. A. SMITH, *Plant Physiol.*, 93, 1990, p. 1063-1070.
- [12] A. CHANSON, J. FICHMAN, D. SPEAR et L. TAIZ, *Plant Physiol.*, 79, 1985, p. 159-164.
- [13] S. PUJARNISCLE, *Physiol. Vég.*, 6, 1968, p. 27-46.
- [14] J. D'AUZAC, *Phytochemistry*, 14, 1975, p. 671-675.
- [15] J. LORQUIN, *Thèse de Doctorat*, Sci. Nat., U.S.T.L., Montpellier II, 1990.
- [16] H. H. TAUSKY et E. SHORR, *J. Biol. Chem.*, 202, 1953, p. 675-685.
- [17] K. GAWEHN, *Methods in Enzymology*, H. U. BERGMAYER éd., Verlag Chem., Weinheim Acad. Press, London, 1974, p. 2239-2245.
- [18] M. M. BRADFORD, *Ann. Biochem.*, 72, 1976, p. 248-254.
- [19] J.-L. JACOB et N. SONTAG, *Biochimie*, 56, 1974, p. 1315-1322.
- [20] J.-C. PREVOT, J.-L. JACOB, J. D'AUZAC, A. CLÉMENT-VIDAL, L. L'HUILLIER et H. CHRESTIN, *C. R. Coll. Physiol. Expl.*, J. L. JACOB et J. C. PRÉVÔT éd., I.R.C.A.-C.I.R.A.D., Montpellier, 1988, p. 217-230.
- [21] J. D'AUZAC, *Phytochemistry*, 16, 1977, p. 1881-1885.
- [22] B. MARTIN, *Biochem. J.*, 229, 1988, p. 459-467.
- [23] C. BREMBERGER, H. P. HASCHKE et U. LÜTTGE, *Planta*, 179, 1988, p. 465-470.
- [24] K. TAKESHIGE et A. HAGER, *Plant Cell Physiol.*, 29, 1988, p. 649-657.
- [25] J.-C. PREVOT, J.-L. JACOB, S. ERRCHIDI et A. VIDAL, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 305, série III, 1987, p. 405-410.
- [26] L. L'HUILLIER, *Diplôme d'Études Approfondies*, U.S.T.L., Montpellier, 1988.
- [27] X. GIDROL, *Thèse Doctorat 3<sup>e</sup> cycle*, Univ. Aix-Marseille-II, Luminy, 1984.

*Laboratoire de Physiologie et de Biochimie de l'I.R.C.A.-C.I.R.A.D.,  
Centre de Montpellier. B.P. n° 5035, 34032 Montpellier Cedex 1.*

## Variabilité enzymatique dans quelques populations naturelles de *Cepaea nemoralis* et *Cepaea hortensis* en France

Annie GUILLER et Luc MADEC

**Résumé** — L'analyse du polymorphisme enzymatique en 8 locus dans 23 populations mixtes ou monospécifiques de *Cepaea nemoralis* et *Cepaea hortensis* fait apparaître une importante diversité protéinique entre les régions bretonne et pyrénéenne. Si les variations graduelles des fréquences alléliques traduisent l'influence des facteurs climatiques, la diminution de l'hétérozygotie dans quelques colonies, soumises probablement à des extinctions fréquentes, laisse en revanche penser à des effets de fondation.

### Enzymatic variation in natural populations of *Cepaea nemoralis* and *Cepaea hortensis* from France

**Abstract** — Analysis of enzymatic polymorphism at 8 loci in 23 mixed or monospecific populations of *Cepaea nemoralis* and *Cepaea hortensis* indicates an important proteinic diversity between Breton and Pyrenean areas. Although gradual variations in allele frequency show the influence of climatic factors, decrease of heterozygosity in some populations probably submitted to frequent extinctions, suggests that founder effect could be involved.

**Abridged English Version** — Variation in allozymes at eight polymorphic loci was examined in 23 monomorphic or mixed populations, representing the two sibling species of landsnails *Cepaea nemoralis* and *Cepaea hortensis*, from two regions in France: Brittany and Pyrenees (Fig. 1). Samples, including 18 populations of *Cepaea nemoralis* and only 5 populations of *Cepaea hortensis*, were analysed by vertical polyacrylamide gel electrophoresis.

This study allows first the extension of the electrophoretic analysis of *Cepaea nemoralis* to a new area (Brittany) and secondly investigation of possible covariations between the two species when populations are conspecific.

The great proteinic diversity between the two regions is principally caused by changes of majority allele either of the two alternative allozymes EST-1<sup>98</sup> and EST-1<sup>100</sup> which appear respectively in Breton and Pyrenean samples. This phenomenon, which has already been noticed not only between regions ([8], [9]) but also between areas much closer together ([1], [2], [3], [10]), could depend on the geographic location of the populations; in this way, the frequency of the two uncommon electromorphs EST-1<sup>95</sup> and EST-1<sup>98</sup> increases with lower altitude in some Pyrenean valleys (Aude, Ariège, Ossau, Oléron and Aure). Differentiation between populations also arises from gradual increase in some genic frequencies; more exactly, "fast" electromorphs seem better to characterize northern strains of *Cepaea hortensis* (EST-1<sup>102</sup>, EST-1<sup>104</sup>, LAP-1<sup>103</sup>, GOT-1<sup>106</sup> represent Breton and Parisian populations), and southern strains of *Cepaea nemoralis* (PGM-3<sup>110</sup>, LAP-1<sup>103</sup>, LAP-2<sup>107</sup>, MDH-1<sup>112</sup> and PGI-1<sup>110</sup> are exclusive or more frequent in Pyrenean populations) (Tables I and II, Fig. 2). These results, even if they are insufficient, could nevertheless illustrate clinal variations proposed by Ochman *et al.* (1987). Such impacts of climatic factors could also explain lower enzymatic variability in three Pyrenean samples (PE1, PE2 and FDP) coming from sites at a high altitude; they show five or six invariable loci according to the population and a particular allele (PGM-3<sup>110</sup>) seems to be fixed.

In plurispecific populations, the same pattern of some allelic frequencies sometimes appears in the two species. The monomorphism of esterases in Monségur (18, E) and the similar

Note présentée par Jean DORST.



genic frequency of the three allozymes LAP-1<sup>98</sup>, LAP-1<sup>100</sup> and LAP-1<sup>103</sup> in Estagniels (12, D) suggest that directional selection could be involved.

Results on genic diversity indicate similar divergences between the two taxons; although lower rates of heterozygosity concern Breton samples for *Cepaea hortensis*, they most often characterize Pyrenean populations for *Cepaea nemoralis* and especially those from higher altitude (Tables I and II, Fig. 1). Mountain populations of the brown snail *Helix aspersa* also present lower genic diversity (work in progress). This astonishing decrease, probably related with climatic factors, could be extended to the mixed samples from Lorient Fort-Bloqué (2) in which the lower heterozygosity of the three species studied (*Cepaea nemoralis*, *Helix aspersa* and *Theba pisana*) reflects hard ecological conditions of this site (sparse vegetation, sandy soil). This occurs in Mediterranean strains of *Theba pisana* in which populations living on sands are significantly less heterozygous than those living on calcareous sandstones [13].

Finally, this preliminary work shows that different modes of genetic variation seem to exist according to the enzymatic loci considered. The geographical location of samples, fairly representative of the heterogeneous environment inhabited by *Cepaea nemoralis* and *Cepaea hortensis*, emphasizes predominant action of climatic factors on proteinic variability when populations belong to different latitudinal or altitudinal areas. However, this selection occasionally seems to share in stochastic processes as the founder effect; the three Pyrenean populations PE1, PE2 and FDP could illustrate this interaction owing to the fact that altitude must induce frequent extinctions.

---

La diversité des milieux colonisés par *Cepaea nemoralis* semble expliquer une part importante de la variabilité géographique du polymorphisme enzymatique observée chez cette espèce. La mise en évidence de clines des fréquences alléliques, tant au niveau altitudinal ([1], [2], [3]) que latitudinal [4], illustre clairement le rôle de cette hétérogénéité écologique.

Cette étude préliminaire s'appuie sur la variabilité enzymatique de populations monospécifiques ou mixtes des espèces jumelles *Cepaea nemoralis* et *Cepaea hortensis*. Jusqu'à présent, seule *Cepaea nemoralis* a fait l'objet de nombreux travaux, la plupart ayant pour cadre les Pyrénées. La considération d'une nouvelle région telle la Bretagne et l'analyse de colonies de *Cepaea hortensis* devraient donc non seulement élargir notre connaissance du polymorphisme de *Cepaea nemoralis* mais surtout illustrer un autre type d'analyse de la variabilité génétique basée sur des comparaisons interspécifiques.

Les échantillons, collectés sur des surfaces inférieures à 400 m<sup>2</sup> correspondant à l'unité panmictique [5], sont issus de colonies localisées essentiellement en Bretagne et en région pyrénéenne (*pl. I*). Les populations de *Cepaea nemoralis* et *Cepaea hortensis*, respectivement au nombre de 18 et 5, sont analysées au moyen de la technique d'électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide. Huit locus polymorphes sont retenus : deux de leucine-aminopeptidase (LAP-1 et LAP-2), un des estérases (EST-1), un de phosphoglucose-isomérase (PGI-1), un de phosphoglucomutase (PGM-3), un de malate-deshydrogénase (MDH-1), un de superoxydedismutase (SOD-1) et un de glutamate-oxalo-transaminase (GOT-1). Le déterminisme génétique de ces locus a déjà été élucidé chez *Cepaea nemoralis* ([1], [2]); seul, celui des estérases a été établi chez *Cepaea hortensis* ([6], [7]).

Les fréquences alléliques relatives aux deux espèces sont présentées dans les tableaux I et II. Notons que ces deux taxons ont en commun six électromorphes : LAP-1<sup>100</sup>, LAP-2<sup>Nul</sup>, GOT-1<sup>100</sup>, SOD-1<sup>100</sup>, PGM-3<sup>100</sup> et PGM-3<sup>105</sup>.

La différenciation enzymatique apparaît d'autant plus grande que les échantillons sont originaires de localités éloignées. Dans les Pyrénées, trois colonies de *Cepaea nemoralis* de plus haute altitude (6, 7, 8) se distinguent des autres populations par l'exclusivité de l'allèle PGM-3<sup>110</sup> et le monomorphisme de cinq voire six locus (*pl. II*).

Les divergences entre les autres échantillons de *Cepaea nemoralis* s'expliquent avant tout par un changement d'allèle majoritaire au locus EST-1 (*pl. II*). L'allèle 100, prédominant dans les Pyrénées, se substitue largement à l'allèle 98 des autres colonies. Ce phénomène a déjà été constaté non seulement entre régions ([8], [9]) mais entre zones beaucoup plus proches géographiquement ([1], [2], [3], [10]). Ainsi, l'accroissement de la fréquence des allèles minoritaires (EST-1<sup>95</sup> et EST-1<sup>98</sup>) constaté d'une part dans les populations de basse altitude des vallées de l'Aude et de l'Ariège (<750 m) et d'autre part, dans le secteur atlantique des Pyrénées (vallées d'Aure, d'Ossau et d'Oléron), constituerait une étape transitoire à la réalisation d'un tel changement.

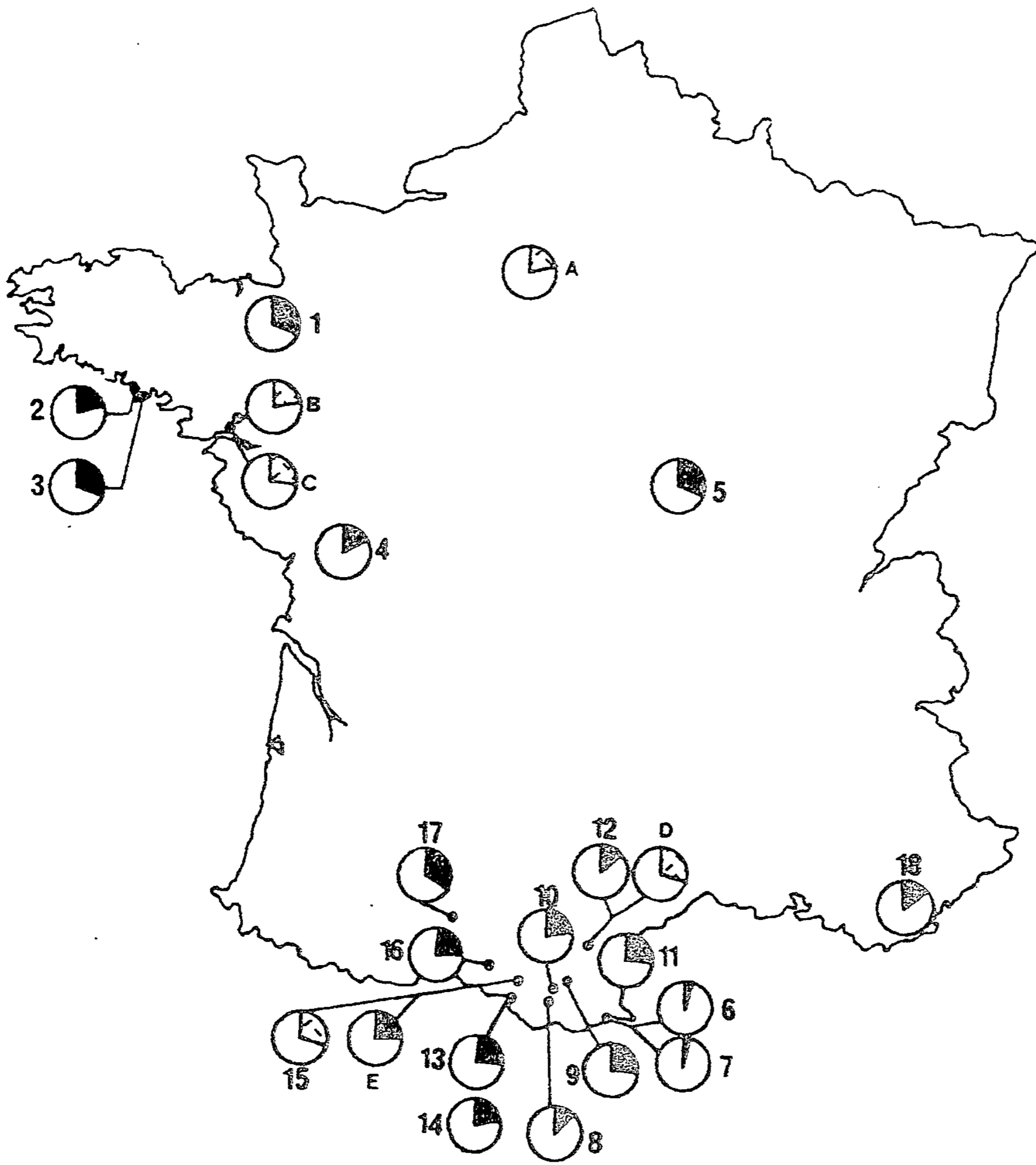
Aux autres locus, la différenciation entre les populations repose sur des allèles rares dont certaines variations des fréquences ne semblent cependant pas aléatoires. En effet, les électromorphes rapides LAP-1<sup>103</sup>, LAP-2<sup>107</sup>, MDH-1<sup>112</sup> et PGI-1<sup>110</sup>, sont décelées seulement dans les échantillons du Sud de la France alors que les allozymes plus lentes caractérisent davantage la Bretagne (LAP-2<sup>94</sup> apparaît uniquement en 3, PGI-1<sup>94</sup> figure dans toutes les colonies bretonnes) (*pl. II*). Des données provenant de populations parisiennes et pyrénéennes s'accordent avec ces observations ([1], [2], [3], [10]). On remarque de même chez *Cepaea hortensis*, malgré le nombre faible de populations analysées, l'exclusivité ou la fréquence plus élevée des allèles LAP-1<sup>103</sup>, EST-1<sup>102</sup>, EST-1<sup>104</sup> et GOT-1<sup>106</sup> dans les colonies des régions bretonne et parisienne. A l'inverse, SOD-1<sup>115</sup> et PGI-1<sup>108</sup> ne sont identifiés qu'à Monségur (E) où PGI-1<sup>104</sup> devient aussi très commun.

Dans notre zone d'étude, les électromorphes rapides caractérisent donc les populations localisées le plus au Nord pour *Cepaea hortensis*, le plus au Sud pour *Cepaea nemoralis*. L'existence de ces allèles alternatifs de même que l'accroissement de certaines fréquences alléliques, selon la région étudiée, rappellent les variations clinales mises en évidence par Ochman et coll. [4]. Une telle illustration supposant l'impact de l'hétérogénéité climatique sur la variabilité allélique s'observe également aux locus LAP-1 et EST-3 chez *Helix aspersa* [12].

La présence d'allèles particuliers à quelques populations entraîne aussi des divergences entre les secteurs prospectés. Ainsi, MDH-1<sup>96</sup> est uniformément réparti dans toutes les colonies de *Cepaea nemoralis*, tandis que l'allèle lent de ce locus n'est recensé qu'en région pyrénéenne chez *Cepaea hortensis* (D, E). En revanche, l'allozyme MDH-1<sup>104</sup> de *Cepaea nemoralis*, bien représentée à Lorient et en région parisienne où elle devient majoritaire [10], est absente dans les Pyrénées.

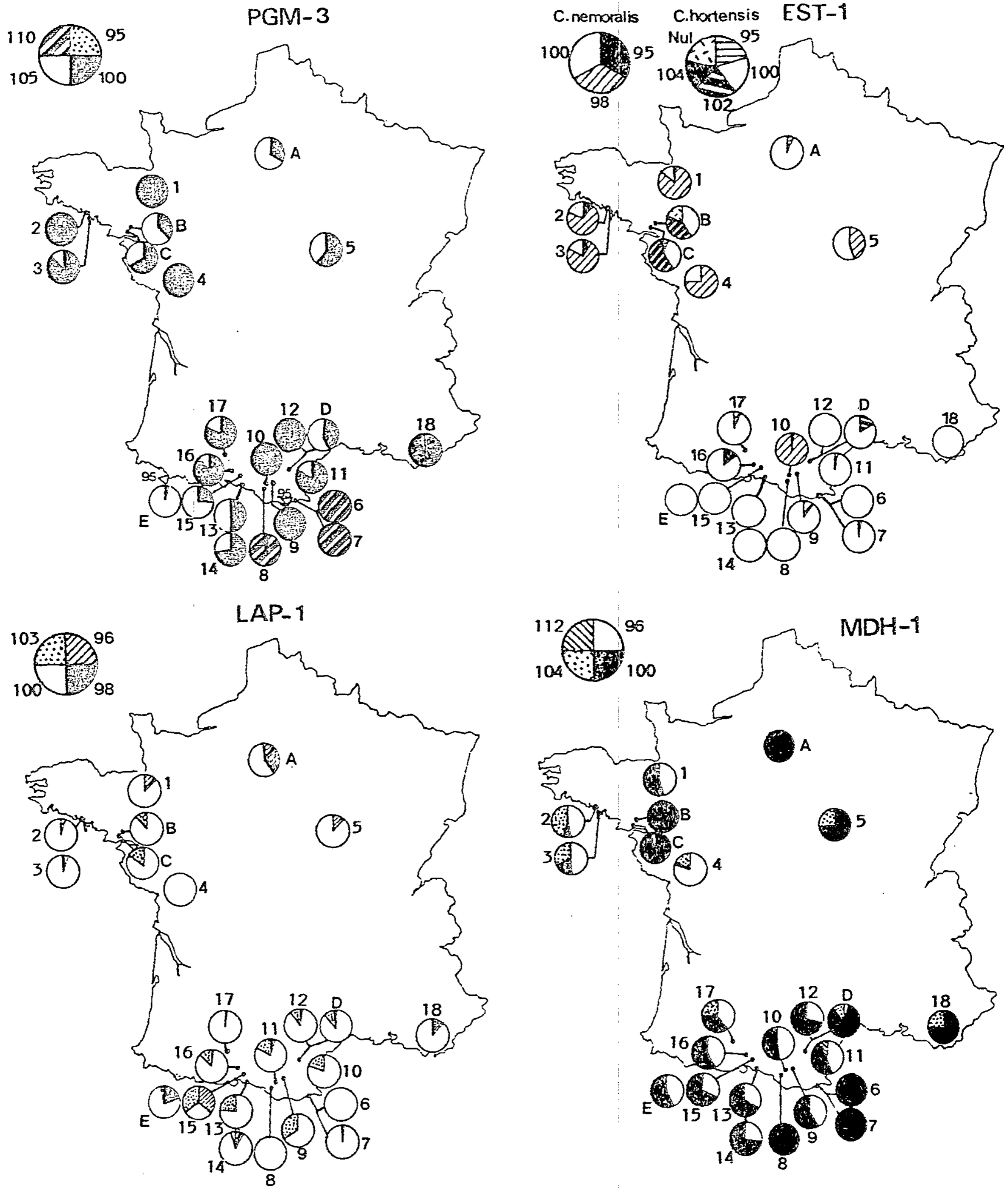
Concernant les électromorphes communes aux deux espèces, PGM-3<sup>105</sup> est prédominante dans quatre échantillons de *Cepaea hortensis*. Chez les deux taxons, l'allèle 100 du locus GOT-1 semble fixé dans la majorité des colonies; les populations mixtes de Campbon (A) et La Chapelle (B) constituent toutefois une exception notable (présence de GOT-1<sup>106</sup>) car les *Helix aspersa* de ces mêmes stations se distinguent également par une augmentation de la variabilité à ce locus [12].





Localisation géographique et hétérozygotie calculée moyenne des populations de *Cepaea nemoralis* (trait plein) et *Cepaea hortensis* (pointillé).

Collection localities and mean genic diversity in populations of *Cepaea nemoralis* (shaded) and *Cepaea hortensis* (stippled).



Fréquences alléliques aux locus PGM-3, EST-1, LAP-1 et MDH-1 dans les populations de *Cepaea nemoralis* et *Cepaea hortensis*.

Allele frequencies at PGM-3, EST-1, LAP-1 and MDH-1 loci in *Cepaea nemoralis* and *Cepaea hortensis* populations.

TABLEAU II

Fréquences alléliques à huit locus enzymatiques dans les populations de *Cepaea hortensis* (Hc : hétérozygotie calculée).Allele frequencies at eight enzymatic loci in *Cepaea hortensis* populations (Hc: genic diversity).

Locus	Allèle	Populations de <i>Cepaea hortensis</i>				
		Région parisienne	Bretagne		Pyrénées	
		SLE A	CPB B	CHA C	EST D	MSG E
PGM <sub>3</sub>	100	0,338	0,354	0,587	0,417	0,028
	105	0,663	0,646	0,413	0,583	0,972
Hc		<b>0,447</b>	<b>0,457</b>	<b>0,485</b>	<b>0,486</b>	<b>0,054</b>
EST <sub>1</sub>	95	—	—	0,019	—	—
	100	0,938	0,406	0,404	0,833	1,000
	102	0,062	0,375	0,577	0,167	—
	104	—	0,031	—	—	—
	Nul	—	0,188	—	—	—
Hc		<b>0,117</b>	<b>0,658</b>	<b>5,504</b>	<b>0,278</b>	<b>0,000</b>
LAP <sub>1</sub>	96	0,075	—	—	—	—
	98	0,313	—	—	0,042	0,556
	100	0,575	0,885	0,817	0,875	0,361
	103	0,038	0,15	0,183	0,043	0,083
Hc		<b>0,545</b>	<b>0,203</b>	<b>0,299</b>	<b>0,226</b>	<b>0,554</b>
LAP <sub>2</sub>	94	0,163	0,170	0,029	0,250	—
	96	0,025	0,050	0,135	—	0,250
	100	0,813	0,570	0,716	0,667	0,750
	104	—	—	—	0,083	—
	Nul	—	0,200	0,135	—	—
Hc		<b>0,313</b>	<b>0,582</b>	<b>0,470</b>	<b>0,486</b>	<b>0,375</b>
MDH <sub>1</sub>	96	—	—	—	0,042	0,417
	100	1,000	1,000	0,990	0,833	0,583
	104	—	—	0,010	0,125	—
PGI <sub>1</sub>	90	—	0,031	0,010	—	—
	94	0,075	0,594	0,260	0,075	0,500
	100	0,900	0,375	0,731	0,900	0,458
	104	0,025	—	—	0,025	0,042
	108	—	—	—	—	—
Hc		<b>0,184</b>	<b>0,506</b>	<b>0,398</b>	<b>0,538</b>	<b>0,496</b>
SOD <sub>1</sub>	100	1,000	1,000	1,000	1,000	0,722
	115	—	—	—	—	0,278
Hc		<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,401</b>
GOT <sub>1</sub>	100	0,988	0,927	0,952	1,000	1,000
	106	0,012	0,073	0,048	—	—
Hc		<b>0,024</b>	<b>0,135</b>	<b>0,032</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
H̄c		<b>0,206</b>	<b>0,217</b>	<b>0,257</b>	<b>0,288</b>	<b>0,296</b>

Dans les colonies mixtes de *Cepaea nemoralis* et *Cepaea hortensis*, les deux espèces adoptent à certains locus des comportements enzymatiques similaires. A Estagniels (12, D), les trois électromorphes du locus LAP-1 se caractérisent non seulement par des mobilités relatives identiques (LAP-1<sup>100</sup>) ou voisines (LAP-1<sup>98</sup>; LAP-1<sup>103</sup>), mais également par des fréquences alléliques semblables. Une répartition apparemment non aléatoire de certaines allozymes se retrouve aussi à Monségur (18, E); l'espèce *Cepaea hortensis* présente en effet des particularités (fréquence élevée de MDH-1<sup>96</sup>; monomorphisme du locus EST-1) qui la rapprochent sensiblement des *Cepaea nemoralis* collectés dans cette même station. En dépit du nombre très réduit de colonies plurispécifiques étudiées, la concordance de certaines variations enzymatiques entre les deux espèces coexistantes

traduit l'influence possible de l'altitude sur la structure génétique des populations pyrénéennes.

La valeur des hétérozygoties calculées moyennes relatives à chacune des populations confirme les observations précédentes (*pl. I*). Ainsi, les Pyrénées semblent être le siège d'une plus grande variabilité génétique chez *Cepaea hortensis*, alors qu'une diminution de l'hétérozygotie, surtout flagrante à plus haute altitude, s'observe chez *Cepaea nemoralis*, notamment aux locus EST-1 et PGI-1. Signalons à cet égard l'impact possible de l'altitude sur le polymorphisme dans des populations d'escargots Petits-Gris vivant à plus de 1 000 m dans les Alpes-maritimes (étude en cours). Ces valeurs généralement plus faibles de l'hétérozygotie attendue sont certainement liées à des conditions écologiques difficiles. Un parallèle peut être fait avec la colonie bretonne du Fort-Bloqué (2) où les conditions extrêmes imposées par l'arrière-dune littorale (sol sablonneux, végétation clairsemée adaptée à la sécheresse ambiante) induisent une baisse de la diversité génique, phénomène qui s'étend par ailleurs aux espèces *Theba pisana* et *Helix aspersa* récoltées dans la même station [1] ou en région méditerranéenne sur terrain sableux [13].

Ces résultats préliminaires suggèrent l'influence de plusieurs types de facteurs sur la différenciation protéinique des populations. Le rôle prédominant de facteurs climatiques sur les transitions graduelles de certaines fréquences alléliques, constatées entre différentes zones altitudinales des Pyrénées ([1], [2], [3]), se manifeste dans notre étude sur une échelle latitudinale. Ces variations clinales, considérées le plus souvent comme adaptatives, associées à des variations apparemment non aléatoires des diversités géniques moyennes, caractérisent les deux taxons. On peut alors imaginer que des divergences entre espèces sont le fait d'exigences écologiques différentes permettant à *Cepaea nemoralis* et *Cepaea hortensis* de cohabiter de façon stable dans des milieux hétérogènes ([14], [15]).

L'intervention de certains phénomènes aléatoires comme les effets de fondation paraît plus évidente dans les trois colonies de plus haute altitude et celle de l'arrière-dune littorale où la diminution de la variabilité génétique peut provenir d'extinctions fréquentes, en raison des conditions écologiques rigoureuses.

Les auteurs remercient profondément M. le Professeur M. Lamotte sans lequel cette étude n'aurait pu être réalisée.

Note remise le 11 juin 1990, acceptée après révision le 11 février 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. VALDEZ-FORSANS, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 296, série III, 1983, p. 1045-1047.
- [2] M. VALDEZ-FORSANS, *Pub. Labo. Zool. E.N.S.*, 29, 1986, 181 p.
- [3] I. KASSEM, M. LAMOTTE et M. VALDEZ, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 306, série III, 1988, p. 405-407.
- [4] M. OCHMAN, J. S. JONES et R. K. SELANDER, *Heredity*, 58, 1987, p. 127-138.
- [5] M. LAMOTTE, *Bull. Biol. Fr.*, Suppl. 35, 1951, p. 1-239.
- [6] G. S. OXFORD, *Heredity*, 30, 1973 a, p. 127-139.
- [7] G. S. OXFORD, *Biochem. Genetics*, 8, 4, 1973 b, p. 365-382.
- [8] J. S. JONES, R. K. SELANDER et G. D. SCHNELL, *Biol. J. Linn. Soc.*, 14, 1980, p. 359-387.
- [9] M. S. JOHNSON, *Heredity*, 43, 1979, p. 137-141.
- [10] I. KASSEM, *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 113, (2), 1988, p. 169-174.
- [11] A. GUILLER, *D.E.A. Biol. Agro.*, Univ. Rennes-I, 1988, 111 p.
- [13] E. NEVO et Z. BAR, *Population Genetics and Ecology*, S. KARLIN et E. NEVO éd., Acad. Press, N. Y., 1976, p. 141-168.
- [14] M. LAMOTTE et J. GENERMONT, *Coll. Int. C.N.R.S.*, J. CHALINE éd, 330, 1983, p. 295-301.
- [15] J. GENERMONT et M. LAMOTTE, *Boll. Zool.*, 53, 1986, p. 215-237.

Université de Rennes-I, Laboratoire de Zoologie et Ecophysiologie.  
avenue du Général-Leclerc, 35042 Rennes.

## Mise en évidence et caractérisation d'une substance apparentée à l'ocytocine dans les cellules surnuméraires des ganglions génitaux de la sangsue *Erpobdella octoculata*

Martine VERGER-BOCQUET, Michel SALZET, Christian WATTEZ et Jean MALECHA

**Résumé** — Une substance apparentée à la partie C-terminale de l'ocytocine a été détectée par des techniques immunocytologiques et biochimiques dans les cellules surnuméraires des ganglions génitaux d'*Erpobdella octoculata*. Elle est colocalisée dans ces neurones avec le FMRF amide. Elle est vraisemblablement présente sous deux formes, l'une monomérique, l'autre dimérique.

### Evidence and characterization of an oxytocin-like substance in the supernumerary cells of the sex ganglia of the leech *Erpobdella octoculata*

**Abstract** — A substance related to the C-terminal part of oxytocin has been detected with immunocytological and biochemical techniques in the supernumerary cells of the sex ganglia of *Erpobdella octoculata*. This substance is co-localized in these neurones with FMRFamide. It is likely present under two forms: monomeric and dimeric.

**INTRODUCTION.** — Chez les sangsues, la chaîne nerveuse ventrale est constituée de 32 ganglions. Les quatre premiers sont soudés pour former la masse nerveuse sous-œsophagienne. Il en est de même pour les sept derniers qui constituent le ganglion caudal. Les autres, appelés ganglions segmentaires (GS), au nombre de 21, se répartissent à raison d'un par métamère. Ils sont constitués de 400 neurones environ à l'exception de ceux qui innervent les deux segments portant les pores génitaux. Ces ganglions génitaux (GS 5 et GS 6) renferment environ 350 neurones surnuméraires [1]. Ces cellules apparaissent au cours du développement post-embryonnaire ([2], [3]) sous l'effet d'un signal produit par les ébauches génitales mâles [4] et présentent un immunomarquage avec les anticorps anti-FMRFamide ([2], [3], [5]).

Le but de notre travail est de démontrer l'existence dans ces neurones d'un autre antigène reconnu par un anticorps anti-ocytocine.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — Les sangsues *Erpobdella octoculata* ont été récoltées au moment de leur maturation génitale dans un étang à Harchies (Belgique).

L'anticorps anti-ocytocine produit au laboratoire ne présente, en RIA et ELISA, aucune réaction croisée avec l'arginine-vasopressine, et la lysine-vasopressine. Il est spécifique de la partie C-terminale de l'ocytocine; il présente, en RIA et ELISA, 80 % de réaction croisée avec le MSH release inhibiting factor (MIF) et pas de réaction croisée avec la partie N-terminale de l'ocytocine, l'acide tocinoïque.

L'anticorps polyclonal anti-FMRFamide (646) nous a été aimablement donné par le Dr J. Van Minnen, Amsterdam, Pays-Bas.

Pour l'immunocytochimie sur coupes, les pièces sont fixées au Bouin Hollande (sans acide acétique) additionné de 10 % de HgCl<sub>2</sub>, incluses à la paraffine et débitées en coupes de 7 µm d'épaisseur. Les coupes sont traitées selon la technique d'immunofluorescence indirecte. La première incubation avec l'antisérum spécifique au 1/200 dure une nuit à 4°C, la seconde est faite avec une solution au 1/100 d'immunsérum de chèvre anti-IgG

Note présentée par Maurice DURCHON.



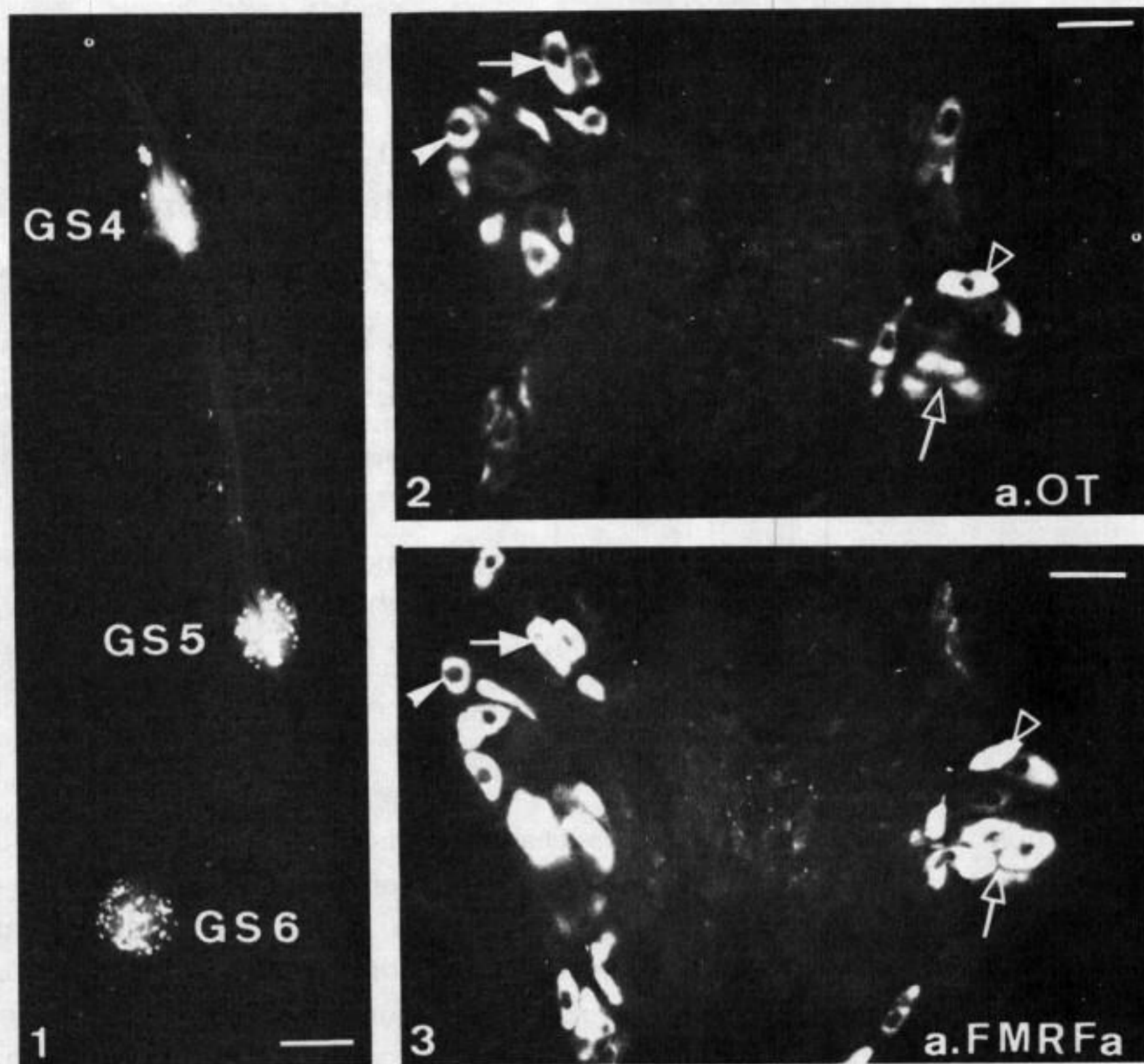


Fig. 1. — Marquage obtenu *in toto* en immunofluorescence sur une portion de chaîne nerveuse comprenant un ganglion segmentaire (GS4) et les deux ganglions génitaux (GS5, GS6) traitée avec un anticorps anti-ocytocine. Barre d'échelle = 200  $\mu\text{m}$ .

Fig. 1. — Immunohistochemical fluorescent micrograph of a whole-mount preparation of a portion of nerve cord featuring a non-sex segmental ganglion (GS4) and the two sex segmental ganglia (GS5, GS6) treated with an anti-ocytocin antibody. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ .

Fig. 2 et 3. — Marquage immunofluorescent sur des coupes adjacentes d'un ganglion segmentaire génital, traitées avec un anticorps anti-ocytocine : *a*-OT (fig. 2) ou avec un anticorps anti-FMRFamide : *a*-FMRFa (fig. 3). Les flèches indiquent les cellules ou les groupes de cellules qui réagissent avec les deux anticorps. Barre d'échelle = 20  $\mu\text{m}$ .

Figs. 2 and 3. — Immunohistochemical fluorescent micrographs of adjacent sections at the level of a sex segmental ganglion treated either with anti-oxytocin: *a*-OT (Fig. 2) or with anti-FMRFamide: *a*-FMRFa (Fig. 3). Arrows indicate the cells or the groups of cells which react with the two antibodies. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

de lapin marqué à la fluorescéine (Sigma). Les coupes sont examinées puis photographiées au microscope à fluorescence Zeiss Axioskop.

Pour l'immunocytochimie sur montages *in toto*, la méthode de marquage utilisée a été décrite antérieurement [6].

Pour l'étude biochimique, les extraits de ganglions segmentaires génitaux obtenus après extraction à l'acide acétique 1M sont prépurifiés sur une colonne C18 sep-pak waters éluée avec de l'acétonitrile à 50%. L'éluat est ensuite fractionné en Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) sur une colonne de phase inverse C18 (Vydac : 25 cm, 5  $\mu\text{m}$ , 300 Å) associée à une précolonne RP 18 (Merck). La colonne est éluée en utilisant un gradient d'eau/TFA (99:1) et d'acétonitrile/TFA (99:1). Les différentes

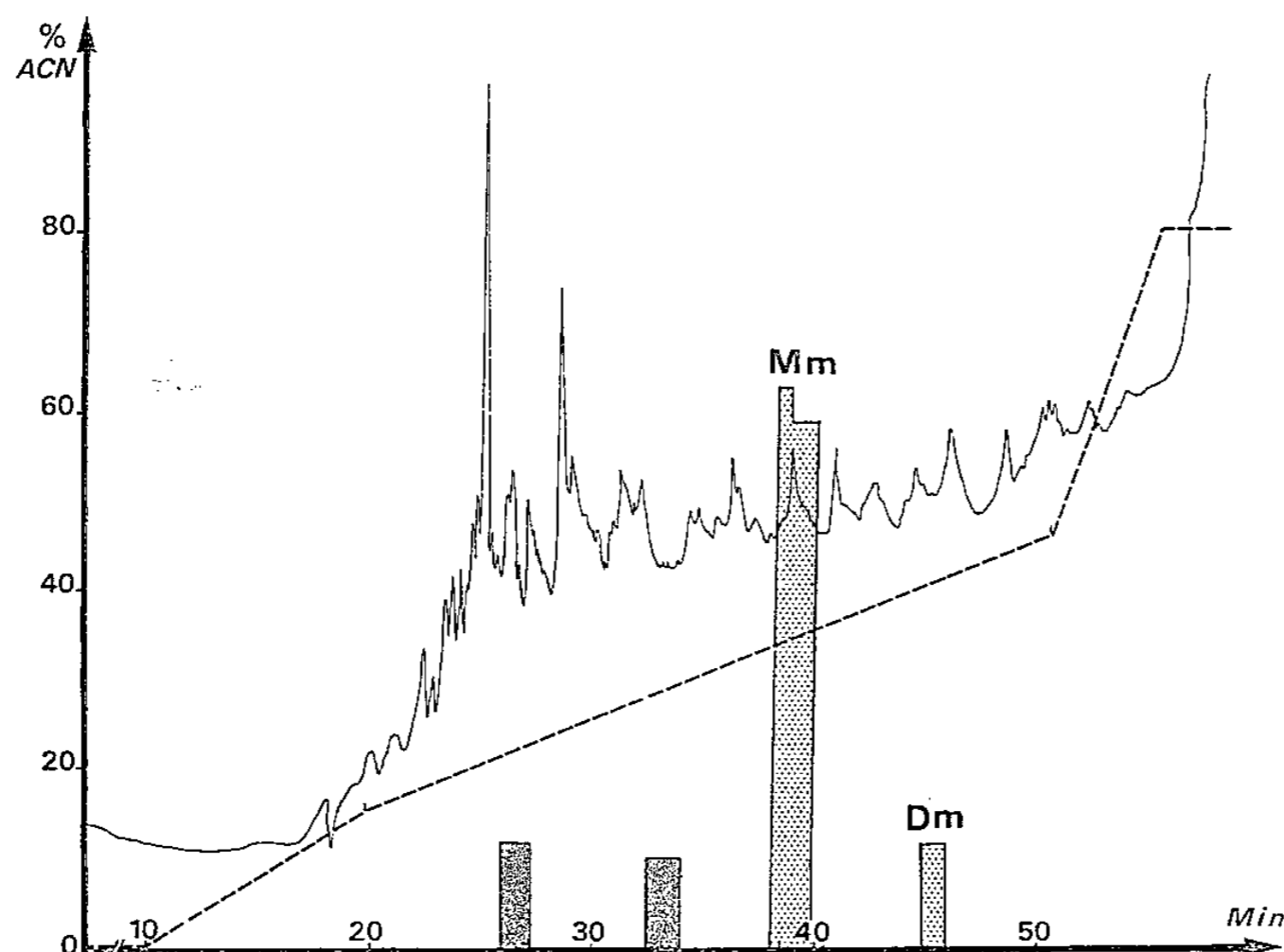


Fig. 4. — Profil en CLHP d'un extrait de ganglions segmentaires génitaux. Vitesse d'élution : 1 ml/mn; solvant A : 0,1 % TFA dans de l'eau; solvant B : 0,1 % TFA dans de l'acétonitrile. Programme d'élution : 10 mn à 0,1 % B, puis gradient de B à 1,5 %/mn de 0 à 15 % suivi par 1 %/mn de 15 à 45 % et par 7 %/mn de 45 à 80 %. La ligne continue indique l'absorbance à 226 nm, la ligne pointillée indique le gradient. ▨ Fractions immunoréactives avec l'anti-OT. ▩ Fractions immunoréactives avec l'anti-FMRFa.

Fig. 4. — HPLC elution profile from an extract of sex segmental ganglia. Elution rate: 1 ml/min.; solvent A: 0,1% TFA in water; solvent B: 0,1% TFA in acetonitrile. Solvent program: 10 min. at 0,1% B then gradient of B at 1,5%/min., from 0 to 15% followed by 1%/min. from 15 to 45% and by 7%/min. from 45 to 80%. The solid line indicates absorbance at 226 nm, the dotted line indicates the gradient. ▨ Fractions immunoreactive with anti-OT. ▩ Fractions immunoreactive with anti-FMRFa.

fractions (1 ml) recueillies, sont analysées en ELISA. La technique ELISA utilisée a été décrite précédemment [6].

RÉSULTATS. — 1. *Étude immunocytologique.* — Des cellules immunoréactives à l'anticorps anti-ocytocine se rencontrent dans tous les ganglions segmentaires de la chaîne nerveuse ventrale d'*E. octoculata*. Alors que ces neurones ne sont qu'au nombre de 8 à 10 par ganglion « normal », on en compte 10 à 20 fois plus dans les ganglions génitaux (GS 5 et GS 6) (fig. 1). Ces derniers sont connus pour posséder des cellules surnuméraires immunoréactives à l'anti-FMRFamide ([2], [3], [5]). Un immunomarquage réalisé sur coupes alternées avec l'anticorps anti-ocytocine et l'anticorps anti-FMRFamide montre que ce sont les mêmes neurones qui réagissent positivement. Une saturation de l'anticorps anti-FMRFamide par de l'ocytocine et vice versa n'entraîne aucune disparition du marquage ce qui suggère la colocalisation de ces deux substances dans les mêmes cellules. Pour vérifier ceci, nous avons procédé à la purification des antigènes.

2. *Étude biochimique.* — L'isolement de la substance ocytocine-like contenue dans ces cellules a été réalisé par fractionnement en CLHP et la recherche des fractions immunoréactives avec l'anticorps anti-ocytocine effectuée en ELISA. Deux zones immunoréactives ont été trouvées. L'une très immunoréactive est éluée à 32 % d'acétonitrile, l'autre à 41 %. La première fraction est instable et engendre rapidement la seconde. Ces deux fractions immunoréactives sont repurifiées en CLHP en isocratique. Les deux produits sont ensuite soumis à un spectre de longueur d'onde qui montre un recouvrement spectral total des pics obtenus, puis sont traités séparément ou en mélange par le

dithiothreitol (DTT) et repassés en CLHP en gradient d'acétonitrile; ils génèrent un pic unique immunoréactif à 26 % d'acétonitrile. Les différentes fractions recueillies après purification en CLHP ont également été éprouvées avec l'anticorps anti-FMRFamide. Deux zones immunoréactives différentes de celles obtenues avec l'anticorps anti-ocytocine sont mises en évidence. La première coélue avec le FMRF oxydé, la seconde avec le FMRFamide.

DISCUSSION. — Chez la sangsue *E. octoculata*, les neurones surnuméraires des ganglions génitaux sont immunoréactifs à un anticorps dirigé contre la partie C-terminale (séquence PRO-LEU-GLY-NH<sub>2</sub>) de l'ocytocine. Il en est de même pour la dizaine de neurones contenant une substance FMRFamide-like de chaque ganglion segmentaire. L'immunoréactivité anti-ocytocine-like n'est plus observée quand l'anticorps est préadsorbé avec la partie C-terminale de l'ocytocine, mais est conservée quand l'anticorps est préadsorbé avec une quantité équivalente de FMRFamide. De plus, nous avons démontré la présence, dans les fractions extraites et purifiées de ces ganglions génitaux, de substances distinctes respectivement immunoréactives à l'anticorps anti-ocytocine et à l'anticorps anti-FMRFamide. L'ensemble de ces résultats est en faveur de la coexistence au sein des cellules surnuméraires des ganglions génitaux d'*E. octoculata* ainsi que dans quelques neurones des autres ganglions segmentaires de deux séquences peptidiques différentes, l'une de type FMRFamide-like, l'autre voisine de la partie C-terminale de l'ocytocine.

Les résultats obtenus en spectre de longueur d'onde et après traitement au DTT des fractions purifiées immunoréactives sont en faveur de l'existence de deux formes de la substance ocytocine-like : l'une monomérique, l'autre dimérique. La même observation a été faite pour la substance de type arginine-vasopressine-like de *Locusta migratoria* [7]; seule la forme dimérique présente l'activité diurétique. Jusqu'à présent le rôle physiologique de la substance ocytocine-like d'*E. octoculata* n'est pas connu. Cependant, l'hormone antidiurétique de la sangsue *Theromyzon tessulatum* ([8], [9]) semble avoir une parenté structurale avec l'ocytocine mammalienne [10].

Nous remercions : J. P. Verhaegen, conservateur du C.R.B. d'Harchies et pour leur collaboration technique : B. Léo, D. Lazarecki, G. Montagne et N. Thesse.

Note remise le 25 juillet 1991, acceptée le 13 août 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] E. R. MACAGNO, *J. Comp. Neurol.*, 190, 1980, p. 283-302.
- [2] C. A. BAPTISTA et E. R. MACAGNO, *J. Neurobiol.*, 19, 1988, p. 707-726.
- [3] J. R. KUHLMAN, C. LI et R. L. CALABRESE, *J. Neurosci.*, 5, 1985, p. 2301-2309.
- [4] C. A. BAPTISTA, T. R. GERSHON et E. R. MACAGNO, *Nature*, 346, 1990, p. 855-858.
- [5] B. D. EVANS et R. L. CALABRESE, *Cell Tissue Res.*, 257, 1989, p. 187-199.
- [6] M. SALZET, M. VERGER-BOCQUET, C. WATTEZ et J. MALECHA, *Comp. Biochem. Physiol.* (sous presse).
- [7] J. P. PROUX, C. A. MILLER, J. P. LI, R. L. CARNEY, A. GIRARDIE, M. DELAAGE et D. A. SCHOOLEY, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 149, 1987, p. 180-186.
- [8] J. MALECHA, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 288, série D, 1979, p. 693-699.
- [9] J. MALECHA, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 49, 1983, p. 344-351.
- [10] J. MALECHA, M. VERGER-BOCQUET, A. LEPRETRE et G. TRAMU, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 309, série III, 1989, p. 127-130.

## Effet de la colchicine sur les neurones à vasopressine et à hormone de mélanocortine de l'hypothalamus du rat : études hybridocytochimique et immunocytochimique

Pierre-Yves RISOLD, Dominique FELLMANN et Claude BUGNON

**Résumé** — 48 h après une injection intra-cérébroventriculaire de 100 µg de colchicine, les IS dirigés contre trois peptides potentiels inclus dans le précurseur de l'hormone de mélanocortine, ne révèlent plus que les grains de sécrétion accumulés dans leurs péricaryons d'origine. Chez les animaux témoins, ces IS marquent sélectivement l'un des compartiments cellulaires (réticulum endoplasmique, Golgi, grains de sécrétion) dans lesquels ce précurseur subit des transformations lors de sa migration. La colchicine provoque aussi une forte diminution du signal autoradiographique d'hybridation de sondes spécifiques des ARNm de ce précurseur. A titre comparatif, à la forte augmentation d'immunoréactivité des neurones producteurs de vasopressine qu'elle entraîne, s'associe une diminution comparable du taux des ARNm du précurseur de ce neuropeptide. Ces faits démontrent la possibilité d'effets de la colchicine se traduisant par une chute du taux des ARNm spécifiques et par un blocage de la synthèse protéique de neuropeptides, consécutifs à l'accumulation des grains de sécrétion dans les péricaryons de deux populations neuronales de l'hypothalamus du rat.

### Effect of colchicine on vasopressin and melanin-concentrating hormone neurons of the rat hypothalamus: hybridocytochemistry and immunocytochemistry studies

**Abstract** — 48 hrs. after an intra-cerebroventricular injection of colchicine (100 µg), antisera to three putative peptides included in the rat melanin-concentrating hormone (MCH) precursor, strongly stained the secretory granules accumulated in perikarya. In control rats, these antisera stained endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, or neurosecretory granules respectively. Colchicine also induced a dramatic decrease in hybridization signal obtained with a probe complementary to the prepro-MCH-mRNA. Similarly, colchicine induced a strong increase in vasopressin immunoreactivity in neurons of the paraventricular and supraoptic nuclei, and a strong decrease of the vasopressin precursor mRNA. These results demonstrated that, in two peptidergic neuron populations of the rat hypothalamus, colchicine lowers mRNAs and impairs neuropeptide protein synthesis, consecutively to the accumulation of neurosecretory granules in perikarya.

**Abridged English Version** — Intra-cerebroventricular injections of colchicine are often used to improve the detection of perikarya of chemically defined neuron populations in the rat brain ([1], [3]-[5]). In the present work, the effect of colchicine on melanin-concentrating hormone-(MCH) or vasopressin-(VP) mRNAs was investigated by *in situ* hybridization. Immunodetection of peptides potentially deriving from the MCH precursor and of VP was also performed in order to verify if colchicine treatment impairs biosynthesis of these peptides, as has been described for liver proteins [11].

Male Sprague Dawley rats received an ICV injection of colchicine (100 µg in 50 µl saline) ( $n=4$ ) or of saline ( $n=2$ ) 48 hrs. before sacrifice. Four untreated rats served as controls.

Brains were processed for immunocytochemistry and *in situ* hybridization as previously described ([2], [6], [8], [12]). Antisera (AS) raised against three peptides (rMCH, neuropeptide glycine-glutamic acid-NGE, neuropeptide glutamic acid-isoleucine-NEI) putatively released from the MCH precursor ([2], [7]) were used. They specifically stain the neuron population previously analyzed with antibodies to human somatostatin 1-37 (GRF37),  $\alpha$ MSH and salmon MCH (sMCH) ([6], [12]). Vasopressin neurons were revealed using an AS to VP supplied by Pr. S. Blasher (Giessen, R.F.A.).

Oligonucleotide probes complementary to VP-mRNA (Oligofit, Genofit, Geneva) and to prepro-MCH-mRNA (rMCH 27, Appligene), were labelled with  $^{32}$ P dCTP by the tailing

Note présentée par Ivan ASSENMACHER.

procedure ([2], [8]). Autoradiographic detection of prepro-MCH-mRNA was quantified using an image analyzer (Quantimet 720, Cambridge) using a program previously described [8].

In control rats, a reticular staining of the perinuclear area was observed using rMCH-AS (*Fig. 1*); it was identical to the golgian staining obtained with sMCH-AS [12]. The granular staining obtained with NGE-AS (*Fig. 2*) could be compared with the staining of the neurosecretory granules observed with GRF37-AS [12]. NEI-AS (*Fig. 3*) diffusely stained the cytoplasm of the perikarya, as previously observed with an acetylcholinesterase-AS (AChE-AS), which revealed rough endoplasmic reticulum cisternae [12].

In colchicine-treated rats the staining obtained with rMCH-, NGE- and NEI-AS were more intense and granular in aspect. This treatment also increased the staining obtained with VP-AS in paraventricular and supraoptic nuclei. Conversely, hybridization of VP and MCH oligonucleotide probes dramatically decreased in colchicine-injected rats (*Figs. 5, 7, 9*) compared with the control animals (*Figs. 4, 6, 8*). Morphometric investigations showed a 60% decrease of the hybridization signal over MCH perikarya (*Fig. 10*).

In colchicine-injected rats, AS to peptides encoded in the MCH precursor stained only those neurosecretory granules which are accumulated in the somatal cytoplasm. Rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, where MCH precursor is synthesized and processed, were no longer stained. These results suggest that colchicine inhibits the biosynthesis of the MCH precursor.

Our results also demonstrate that a large amount of colchicine (100 µg/48 hrs.) induced a strong decrease in VP- and MCH-mRNAs. It has been previously reported that smaller amounts (7 µg) for a shorter time (24 hrs.) stop the release of neuropeptides [10] but have little effect on their somatal accumulation, and no effect on their synthesis [9].

Therefore, it seems likely that colchicine affects, in a dose- and time-dependent manner, release, axonal transport and finally biosynthesis of neuropeptides. Under our conditions, a toxic effect of colchicine on transcription and translation processes cannot be ruled out. However, the observed effects may also be explained by the strong peptide accumulation in the perikarya. In this case, neuropeptides or some of their degradation products would modulate the translation rate and/or the turnover of their mRNAs.

---

INTRODUCTION. — La colchicine, injectée par voie intra-cérébroventriculaire, entraîne la destruction du système microtubulaire dans les neurones et une accumulation des grains de sécrétion dans les péricaryons peptidergiques qui en permet une meilleure caractérisation immunohistochimique ([1], [3] à [6]).

Dans ce travail, nous avons recherché par hybridocytochimie et par immunocytochimie les effets de la colchicine sur la teneur en ARNm spécifique et leur traduction en neuropeptide dans les neurones à vasopressine (VP) et dans ceux élaborateurs du précurseur de l'hormone de mélanocortine (MCH).

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Nos études ont porté sur 12 rats mâles de 200 g de la souche OFA Sprague Dawley (IFFA-Credo), dont 10 ont été répartis en trois lots de : quatre animaux non traités; quatre animaux ayant subi, sous anesthésie au chloral, une injection intracérébro-ventriculaire de colchicine (100 µg/50 µl de NaCl 0,9 %) selon une procédure déjà décrite ([3], [12]); deux animaux témoins ayant reçu dans les mêmes conditions, une injection de 50 µl de NaCl 0,9 %. 48 h après l'injection, les cerveaux ont été fixés par perfusion intracardiaque d'une solution de paraformaldéhyde 1 % (PFA 1 %)

dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Après congélation, ils ont été débités au cryostat en coupes sériées de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Deux autres cerveaux provenant d'un rat témoin et d'un rat traité ont été fixés au PFA 4 % et, débités au vibratome en coupes sériées de 50  $\mu\text{m}$ .

*Les méthodes immunocytochimiques* ont été mises en œuvre avec trois IS préparés au laboratoire par immunisation de lapins avec des peptides dérivés du précurseur de la MCH de rat, récemment cloné ([2], [7]) : IS anti-neuropeptide glycine-acide glutamique (NGE), IS anti-neuropeptide acide glutamique-isoleucine (NEI) et IS anti-MCH de rat (rMCH). Les contrôles de spécificité appliqués à chacun d'eux, concernent l'inhibition des marquages immunocytochimiques après incubation des IS avec les antigènes correspondants, et la reconnaissance de ces antigènes adsorbés sur nitrocellulose (travaux en cours de publication). L'IS anti-vasopressine (VP) nous a été fourni par M<sup>me</sup> le professeur S. Bläsher (Giessen, R.F.A.).

Les coupes au cryostat ont été incubées une nuit à 20°C avec ces IS dilués au 1/100, puis 1 h avec des anticorps anti-IgG de lapin conjugués à la fluorescéine (1/50). Les coupes au vibratome ont été traitées par la technique aux complexes PAP, puis incluses dans l'araldite et débitées en coupes semi-fines de 1  $\mu\text{m}$  [12].

*Pour la technique d'hybridations in situ* nous avons utilisé deux oligonucléotides de synthèse, l'un de 27 bases (Appligène) complémentaire d'une séquence de l'ARNm du prépro-MCH du rat [2] et l'autre de 45 bases (Genofit) complémentaire d'une séquence de l'ARNm du précurseur de la VP. Ils ont été marqués par « tailing » avec du <sup>32</sup>P-dCTP selon une procédure déjà rapportée ([2], [8]). Après une étape de pré-hybridation, les coupes ont été incubées une nuit à 40°C avec 20  $\mu\text{l}$  de tampon renfermant 0,125 ng de l'une ou l'autre des deux sondes. Les marquages ont été révélés par apposition pendant 12 h d'un film de radiographie (Hyperfilm-Amersham), puis par autoradiographie après 7 jours d'exposition des lames émulsionnées (émulsion LMI-Amersham).

Des analyses morphométriques [8] ont été effectuées à l'aide d'un analyseur d'images « Cambridge Quantimet 720 » (Imanco) sur des séries de quatre à six coupes par animal, traitées simultanément en hybridation *in situ*. La surface occupée par le marquage histoautoradiographique sur chaque champ est mesurée en pixels après soustraction du bruit de fond. La surface moyenne du marquage par cellule est obtenue en divisant la surface totale du marquage d'un champ par le nombre de neurones marqués qu'il renferme. Les mesures de surfaces sur les neurones à MCH ont été réalisées dans deux territoires distincts de leur aire de répartition (zona incerta et hypothalamus latéral). L'analyse statistique des données a été effectuée par le test *t* de Student.

RÉSULTATS. — 1. *Études immunocytochimiques*. — Les IS anti-NGE, anti-NEI et anti-rMCH révèlent tous les péricaryons d'une population de neurones localisée dans l'hypothalamus latéral et dorsal postérieur, également pluri-immunoréactifs à des IS anti-GRF37, anti- $\alpha$ MSH, anti-sMCH [6] et anti-acétylcholine estérase (AChE) [12].

*Chez les témoins*, une analyse fine de la distribution intracytoplasmique des marquages immunocytochimiques obtenus avec ces trois IS nous a permis de retrouver des différences déjà observées avec nos IS anti-GRF37, anti- $\alpha$ MSH et anti-sMCH ([6], [12]). En particulier, l'IS anti-rMCH (*fig. 1*) fournit un marquage cytoplasmique très intense, réticulé, périnucléaire de type golgien identique à celui qui avait été décrit avec notre IS anti-sMCH qui reconnaît bien l'appareil de Golgi en microscopie électronique. Le marquage obtenu avec l'IS anti-NGE est très finement granulaire (*fig. 2*), semblable à celui observé avec l'IS anti-GRF37, au sein des mêmes neurones, qui ne révèle que les grains de

sécrétion en haute résolution. L'IS anti-NEI fournit un marquage de fond très diffus de l'ensemble du cytoplasme des péricaryons (*fig. 3*), comparable à celui observé avec un IS anti-AchE, qui révèle le réticulum endoplasmique granuleux en microscopie électronique. Rappelons que chez des animaux non traités, l'IS anti- $\alpha$ MSH ne marque pas ces péricaryons ([6], [12]).

*Après traitement à la colchicine*, les marquages des péricaryons fournis par nos trois nouveaux IS sont beaucoup plus intenses et tous d'aspect granulaire, comme ceux obtenus chez ces animaux avec nos trois IS anti-sMCH, anti- $\alpha$ MSH et anti-GRF37 qui ne reconnaissent alors que les grains de sécrétion en microscopie électronique [12].

*Chez les sujets témoins*, l'IS anti-VP révèle bien des péricaryons dans les territoires magnocellulaires des noyaux paraventriculaires (NPV) et des noyaux supraoptiques (NSO). Cependant, l'intensité de ce marquage diffus du cytoplasme varie d'un péricaryon à un autre.

*Chez les animaux traités à la colchicine*, les marquages obtenus avec cet IS dans les mêmes péricaryons sont tous très intenses et d'aspect granulaire plus net.

2. *Études hybridocytochimiques.* — Les films radiographiques des coupes de cerveaux d'animaux ayant subi une injection de colchicine permettent d'apprécier une très forte diminution du signal hybridocytochimique avec nos deux sondes complémentaires de l'ARNm-MCH et de l'ARNm-VP. Par contre, l'injection intra-ventriculaire de sérum physiologique n'induit aucune modification de ce signal par rapport aux animaux témoins non injectés. Ces observations sont confirmées par l'observation microscopique des lames traitées par histo-autoradiographie : en effet avec la sonde VP, la densité en grains d'argent est beaucoup plus faible au niveau des territoires des NSO et des NPV chez les animaux traités à la colchicine que chez les témoins (*fig. 6-9*). Avec la sonde MCH le signal autoradiographique concerne un nombre plus réduit de neurones dont l'intensité de marquage est nettement plus faible tant au niveau de leur aire de répartition dorsale et dans la zona incerta, que dans les territoires hypothalamiques latéro-postérieurs (*fig. 4, 5*).

L'analyse morpho-densitométrique des cellules MCH+ confirme nos premières constatations. En effet, la surface moyenne du marquage hybridocytochimique par cellule diminue d'environ 60 % (*fig. 10*), cette différence étant hautement significative. L'effet est identique dans les deux régions analysées, zona incerta et aires latérales postérieures, avec une diminution d'environ 20 % des cellules marquées chez les animaux traités par rapport aux témoins.

DISCUSSION. — Une injection ICV de 100  $\mu$ g de colchicine entraîne en 48 h une forte mise en charge des péricaryons en grains de sécrétion tant dans les neurones à VP que dans ceux à MCH. Dans ces derniers, seuls les grains sont immunoréactifs à nos trois IS dirigés contre le NGE ou le NEI ou le rMCH, peptides potentiels de clivage d'une même molécule mère. On constate donc la disparition du marquage spécifique de compartiments cellulaires différents dans lesquels ce précurseur subit des transformations lors de sa migration, obtenus chez les animaux témoins avec chacun de ces IS. Nous avons déjà vérifié des faits similaires en microscopie optique et en microscopie électronique avec des IS anti- $\alpha$ MSH, anti-sMCH et anti-GRF37 sur ces mêmes neurones, chez des rats traités à la colchicine ou témoins ([6], [12]). Par ailleurs, nous avons aussi constaté une disparition du marquage du réticulum endoplasmique par un IS anti-AChE chez les animaux traités à la colchicine [12]. L'ensemble de ces faits paraît témoigner d'une forte diminution ou d'un arrêt de la synthèse du précurseur de la MCH secondaire à l'accumulation des

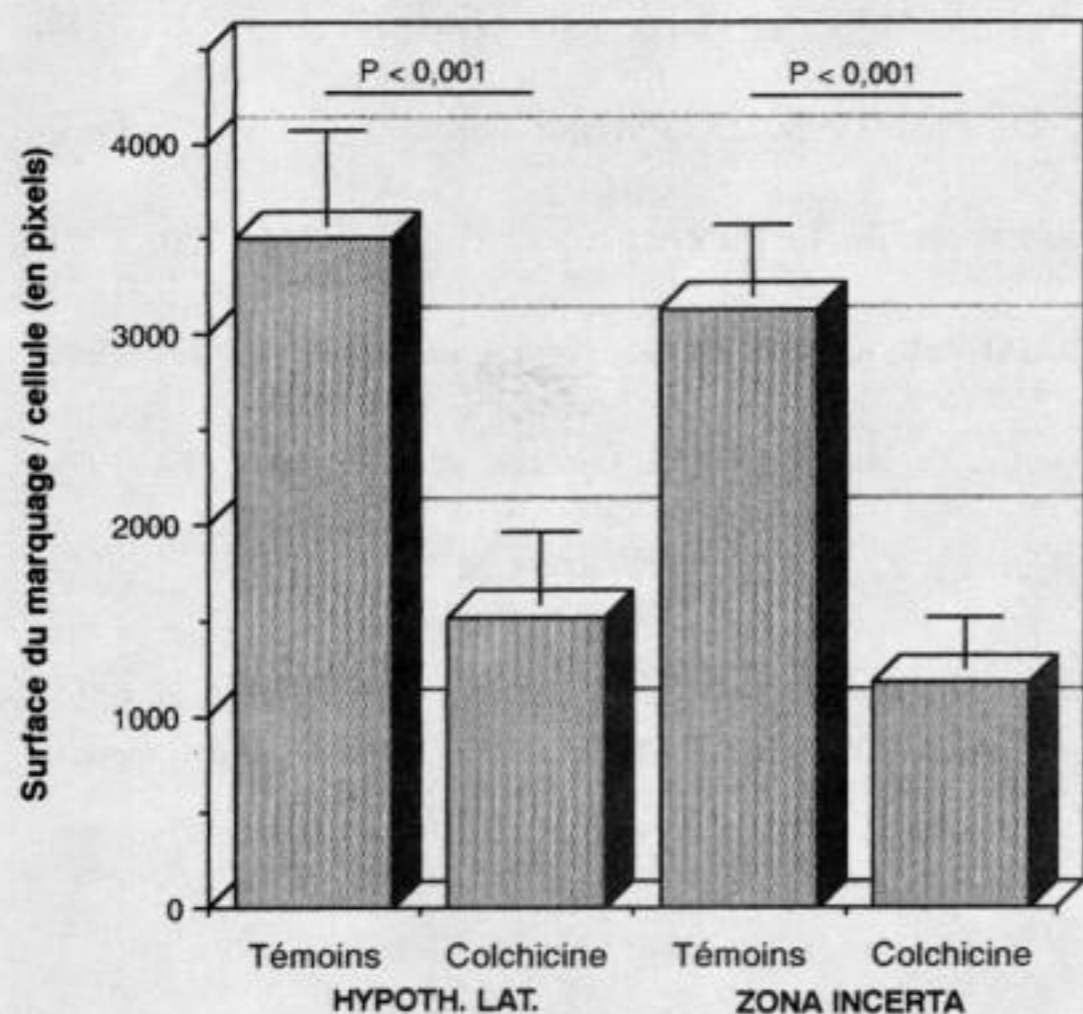


Fig. 10. — Surfaces occupées par le signal hybridocytochimique sur les péricaryons à prépro-MCH chez des rats témoins et traités à la colchicine.

Fig. 10. — Areas of hybridization staining on prepro-MCH perikarya in control and colchicine-injected rats.

grains de sécrétion dans les péricaryons, et, parallèlement, à un arrêt de synthèse de l'AChE. Une inhibition de synthèse protéique hépatique peut être provoquée par la colchicine [11].

Nos résultats d'hybridation *in situ* démontrent une diminution du taux des ARNm-VP et des ARNm-MCH dans leurs neurones élaborateurs respectifs, confirmée par nos études quantimétriques pour les neurones à MCH qui indiquent une chute de 60% du signal d'hybridation. Cette diminution correspond sans doute à une réduction des phénomènes de transcription et/ou de la durée de vie de ces ARNm, peut-être liée à l'augmentation des lysosomes dans les péricaryons [12].

Pour certains, des doses plus faibles de colchicine (7  $\mu$ g) ne provoqueraient en 24 h qu'un blocage de la libération des neuropeptides au niveau des terminaisons [10] et n'auraient que peu d'effet sur le transport axonal des grains de sécrétion et sur les phénomènes de synthèse [9]. Il semble donc que la sensibilité des neurones peptidergiques à la dose et au temps d'action de la colchicine concerne, dans un ordre décroissant, d'abord les phénomènes de libération distale, puis ceux de transport axonal, et enfin ceux de protéosynthèses. Dans nos conditions expérimentales, bien qu'une certaine action toxique directe de la colchicine sur les phénomènes de transcription et de traduction ne puisse être exclue, la forte accumulation des neuropeptides et des lysosomes dans les péricaryons permet d'émettre l'hypothèse que ces neuropeptides eux-mêmes, ou certains produits de leur dégradation partielle par crinolyse, pourraient intervenir pour freiner la transcription et/ou la traduction de leur propre ARNm.

Note remise le 4 mars 1991, acceptée le 8 avril 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] B. BLOCH, A. BAIRD, N. LING et R. GUILLEMIN, *Endocrinology*, 118, 1986, p. 156-162.
- [2] C. BRETON, D. FELLMANN et C. BUGNON, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 309, série III, 1989, p. 749-754.
- [3] C. BUGNON, B. BLOCH et D. LENYS, *Neuroscience*, 6, 1981, p. 1299-1313.
- [4] C. BUGNON, D. FELLMANN, A. GOUGET et J. CARDOT, *Nature*, 298, 1982, p. 159-161.
- [5] D. FELLMANN, C. BUGNON et G. N. LAVRY, *Neurosci. Lett.*, 58, 1985, p. 91-96.
- [6] D. FELLMANN, C. BUGNON et P. Y. RISOLD, *Neurosci. Lett.*, 74, 1987, p. 275-280.



- [7] J. L. NAHON, F. PRESSE, J. C. BITTENCOURT, P. E. SAWCHENKO et W. VALE, *Endocrinology*, 125, 1989, p. 2056-2065.
- [8] E. NORMAND, T. POPOVICI, B. ONTENIENTE, D. FELLMANN, D. PIATIER-TONNEAU, C. AUFRAY et B. BLOCH, *Brain Research*, 439, 1988, p. 39-46.
- [9] D. C. PARISH, E. M. RODRIGUEZ, S. D. BIRKETT et B. T. PICKERING, *Cell. Tiss. Res.*, 220, 1981, p. 809-827.
- [10] P. PENA, E. M. RODRIGUEZ, H. D. DELLMAN et K. SHOEBITZ, *Neuroendocrinology*, 47, 1988, p. 217-224.
- [11] C. M. REDMAN, D. BANERJEE, C. MANNING, C. Y. HUANG et K. GREEN, *J. Cell. Biol.*, 77, 1978, p. 400-416.
- [12] P. Y. RISOLD, D. FELLMANN et C. BUGNON, *Neurosci. Lett.*, 100, 1989, p. 23-28.

*Laboratoire d'Histologie Embryologie cytogénétique, C.N.R.S.-U.R.A. n° 0561,  
Faculté de Médecine et de Pharmacie, place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex.*

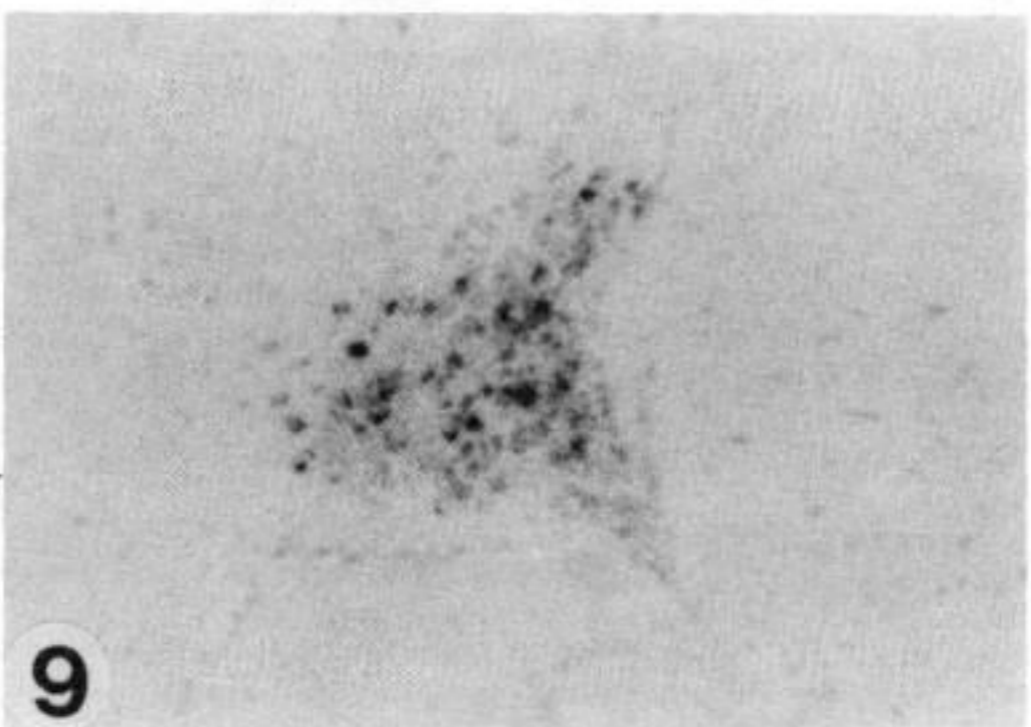
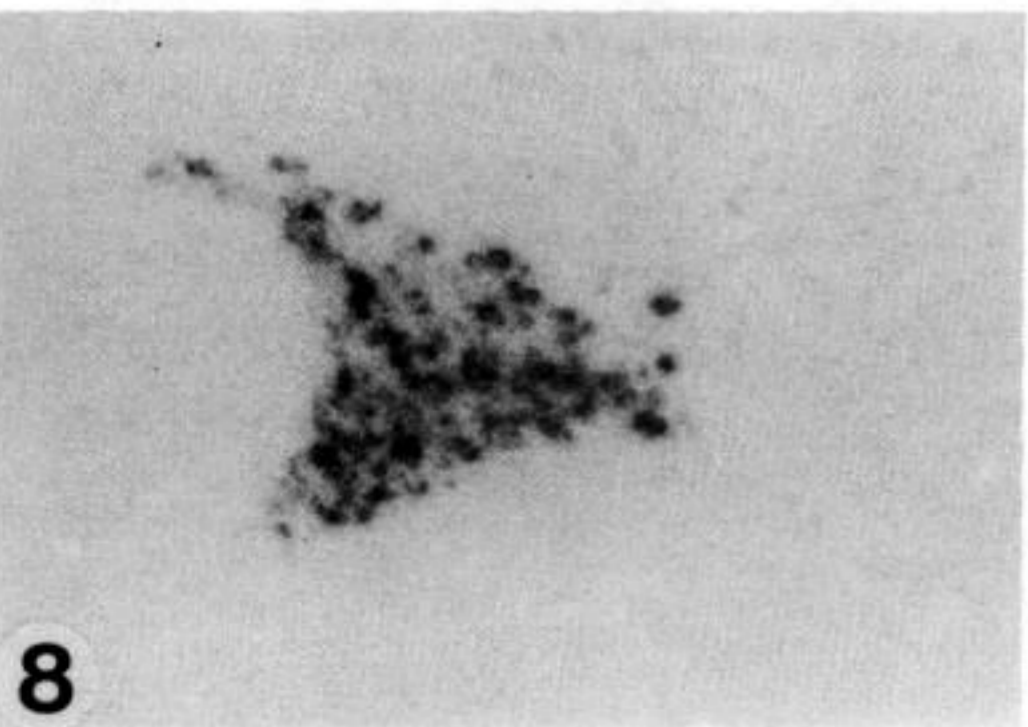
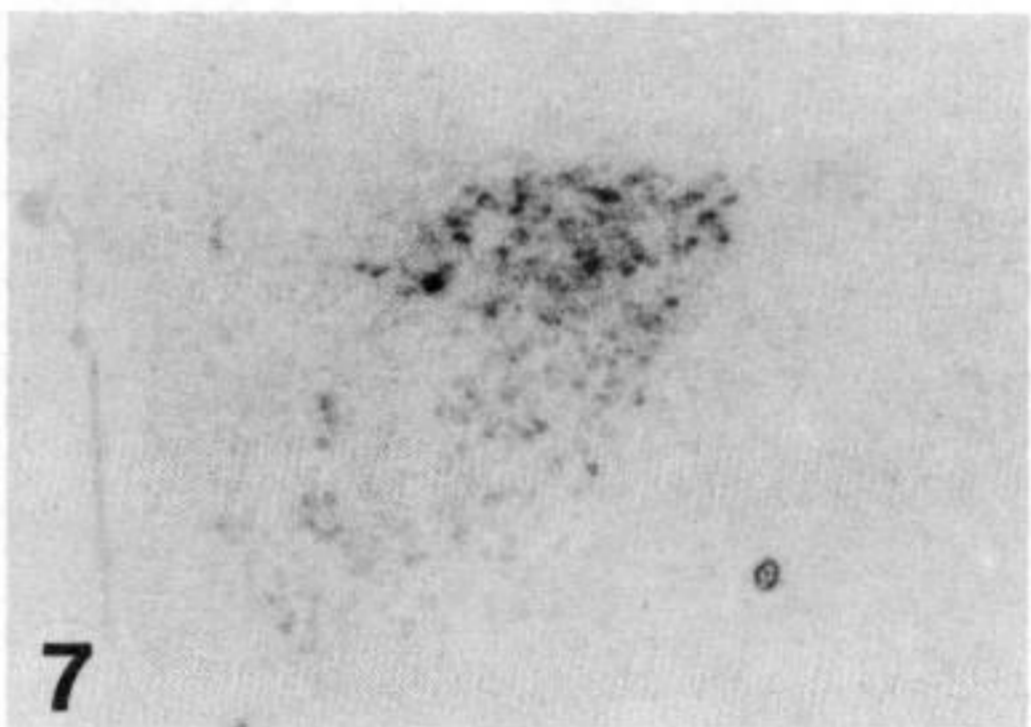
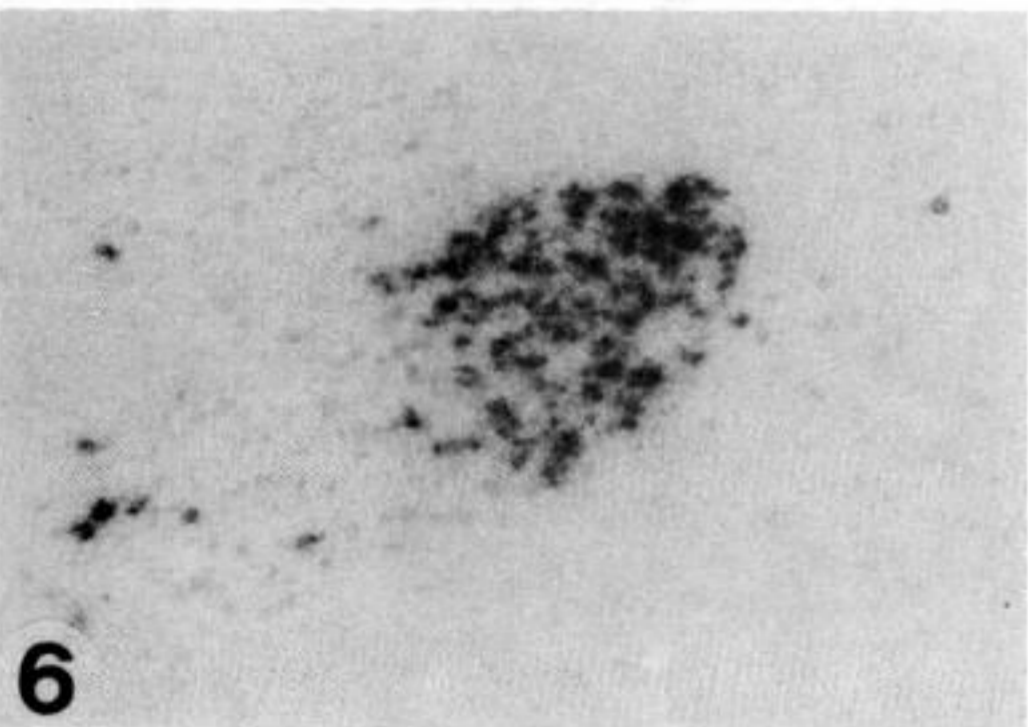
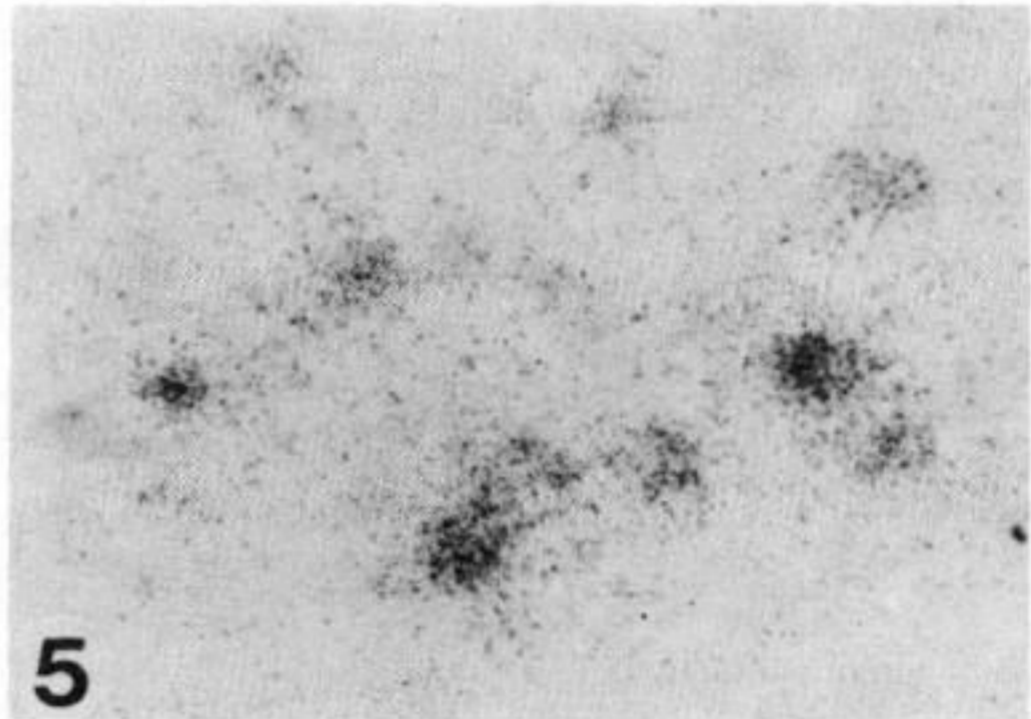
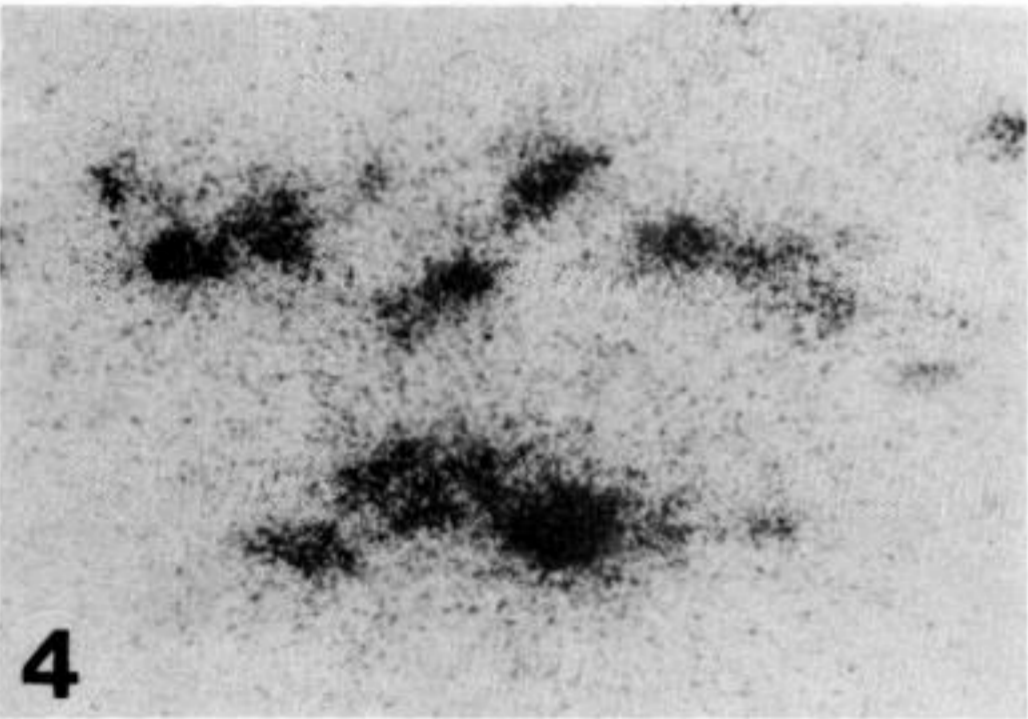
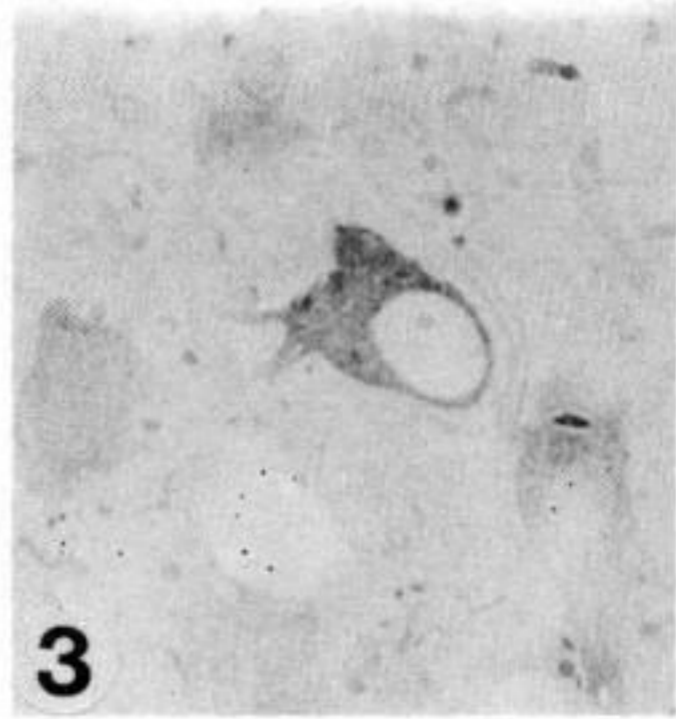
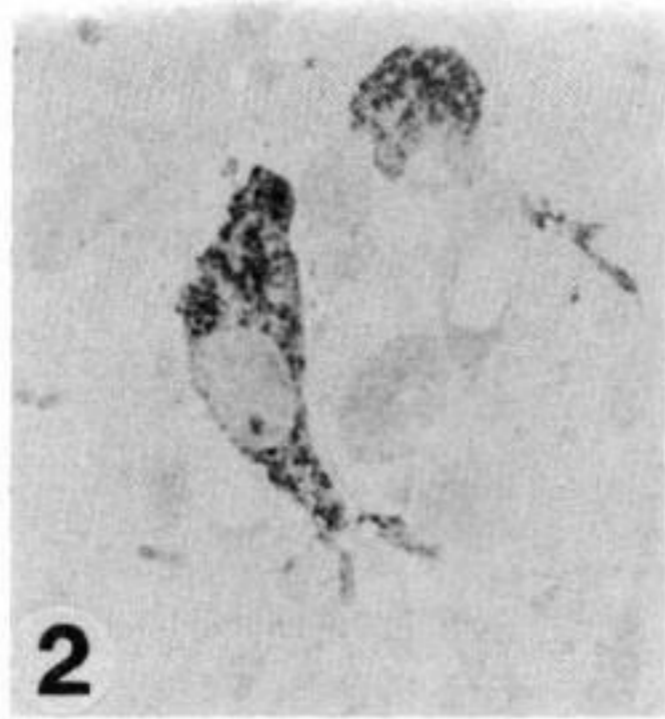
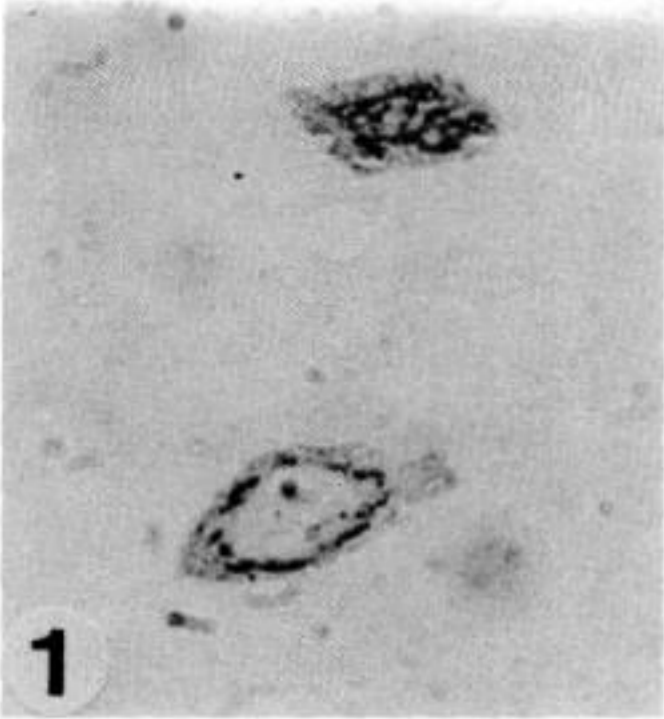
#### EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

Fig. 1-3. — Sur des coupes semi-fines issues d'un rat témoin, l'IS anti-rMCH fournit un marquage réticulé périnucléaire (1), l'IS anti-NGE un marquage granulaire (2) et l'IS anti-NEI un marquage diffus (3) du cytoplasme des péricaryons.

*Figs. 1-3. — On semi-thin sections of control rats, rMCH-AS gave a reticular perinuclear staining (1), NGE-AS a granular staining (2) and NEI-AS a diffuse staining (3) of the cytoplasm of perikarya.*

Fig. 4-9. — Avec la sonde MCH au niveau des neurones de l'hypothalamus latéral et dorsal (4, 5) ou avec la sonde VP dans les noyaux paraventriculaire (6, 7) et supraoptique (8, 9), le signal hybridocytochimique est plus intense chez les animaux témoins (4, 6, 8) que chez ceux traités à la colchicine (5, 7, 9).

*Figs. 4-9. — Using oligonucleotide probes to prepro-MCH mRNA on neurons of the lateral and dorsal hypothalamus (4, 5), or to VP mRNA on paraventricular (6, 7) and supraoptic (8, 9) nuclei, the hybridization signal was more intense in control (4, 6, 8) than in colchicine-injected rats (5, 7, 9).*





Psychophysiologie/*Psychophysiology*  
(Psychologie animale/*Animal Psychology*)

## Chimioréception nasale *in utero*: expériences préliminaires chez le fœtus ovin

Benoist SCHAAL, Pierre ORGEUR, Jean-Pierre LECANUET, Alain LOCATELLI,  
Carolyn GRANIER-DEFERRE et Pascal POINDRON

**Résumé** — Chez le fœtus ovin, l'injection intranasale d'une solution odorante de 2-méthyl-2-thiazoline provoque des décélérations du rythme cardiaque, alors que l'injection d'une solution contrôle (sérum physiologique) n'induit pas de réponse significative. Ceci indique que le fœtus de mouton, comme celui des rongeurs muridés, possède des capacités de détection par les chimiorécepteurs nasaux.

### Nasal chemoreception *in utero*: first data in the fetal sheep

**Abstract** — Intranasal injections of a fragrant solution of 2-methyl-2-thiazoline elicited significant heart rate decelerations in late pregnancy fetal sheep, while the injection of a control fluid (isotonic saline) had no effect. This result indicates that the ovine fetuses are able to detect nasally administered odorants, as previously demonstrated in the fetuses of murine rodents.

**Abridged English Version** — *In utero* chemoreception has been demonstrated in the rat and the mouse. In these species, fetal mere exposure to artificial odorants induces neonatal preference ([1], [2]), or reduced neophobia [3], for any substrate bearing similar odour properties. In addition, neonatal rats display avoidance to odorants which have been paired *in utero* with aversive conditioning ([4], [5]). The present experiment is aimed at examining the possibility of nasal chemoreception in the fetus of a nonrodent placental mammal.

**METHODS.** — After surgical preparation of two near-term ewes (gestational day 144), two fetuses (F 1: male, F 2: female) were externalized from the uterus and amnion in order to be implanted with intranasal catheters and heart rate electrodes. The proximal end of the catheters was positioned to the postero-apical part of the nasal fossae, *i. e.*, in the immediate vicinity to the olfactory areas (controlled by dissection on stillborn lambs). Three catheters were sutured to the *alae nasi*, two of them serving the left naris and one the opposite naris. In order to deliver the stimulations, the distal end of each catheter was connected to a hand-operated syringe. The odorants consisted of citral (CI) (a lemon-like odorant; concentration: 1.7%, [6]), and 2-methyl-2-thiazoline (MT) (a foul odorant; concentration: 10%) solutions in isotonic saline (SP) (NaCl 0.9% in distilled water), which also served as a control stimulus. In the absence of threshold references established in fetal lambs for water-borne odorants, both stimulations were subjectively equalized to the human nose on the basis of intensity assessment of the vapour phases. The testing of the fetuses in the womb started at least 1 hr. after the ewes' complete recovery from anesthesia, which were then standing without constraint. The infusions of the stimuli were made at fetal temperature and with regular pressure (the same trained experimenter operating the syringes). Both odorants were infused into the left nasal fossa, the opposite fossa receiving the control infusions. Because of the tenacity of MT, the order of administration of the stimulations was CI-SP-MT in both fetuses. In between the CI and MT infusions, a volume of fluid equivalent to that previously injected was aspirated in order to avoid potential overpressure and to recover a part of previously injected odorant solution. A total of 6 and 10 successive 100 µl stimuli were

Note présentée par Pierre KARLI.

injected for each condition in F 1 and F 2, respectively. The delay between two successive infusions depended on the fetal heart rate (FHR) return to baseline (it was never inferior to 120 sec.). Infusions were administered during periods of low FHR variability, free of fetal or maternal movements. As mean FHR is affected by cyclic variations [7], both fetuses were tested at the same daytime on successive days. The FHR was picked up using insulated cables (length: 90 cm) welded to silver electrodes subcutaneously implanted. FHR signals were recorded by an electro-cardiograph (HP 8020 A) connected to a computer for storage and analysis. Cardiac periods were computed in ms and converted to HR in beats per minute (bpm). A specifically designed algorithm was used to improve EKG signals. When testing was over, the lambs were delivered by C-section and left by the mother.

For each test, HR changes were plotted as deviations of the average FHR of each poststimulus 3-sec. period from the average FHR of the last prestimulus 3-sec. period. Raw data were analysed with two-way ANOVAs for repeated measures. As sphericity assumption is unlikely for most repeated physiological measures [8], only 2-term comparisons (1 *df*) were used.

RESULTS. — Baseline FHR was stable and within the range of that reported by previous studies ([9], [10]). However, HR variability was different between both fetuses (mean prestimulus FHR: 165.1 and 171.8 bpm; S.D.: 11.3 and 4.6 bpm; range: 144.6-196.4 and 164.1-178.0 bpm for F 1 and F 2, respectively).

Nasal infusions of MT induced transitory FHR decelerations in all tests performed on both fetuses. The magnitude range of the decelerations was 3.3-53.1 bpm attained after 2-9 sec. in F 1, and 3.8-16.4 bpm attained after 5-15 sec. in F 2. Averaged maximum deceleration was of 12 and 8 bpm, reached 6 and 9 sec. after stimulus onset in F 1 and F 2, respectively (*Fig*). This effect was significant in both fetuses [F 1:  $F(1, 150) = 5.34$ ;  $p < 0.05$ ; F 2:  $F(1, 260) = 31.72$ ;  $p < 0.001$ ]. Comparisons between the prestimulus HR bin and the successive poststimulus HR bins indicated that deviations from baseline were significant at 3-9 sec. in F 1 and at 6-30 sec. in F 2.

Injections of CI induced tenuous FHR accelerations in both fetuses (*Fig*). These effects were not significant, although a trend was found in F 1 [ $F(1, 150) = 3.18$ ;  $0.10 > p > 0.05$ ; F 2:  $F(1, 260) = 0.72$ ;  $p > 0.10$ ]. Infusions of saline (SP) induced no effect on the FHR [F 1:  $F(1, 150) = 0.58$ ; F 2:  $F(1, 260) = 1.82$ ;  $p_s > 0.10$ ].

DISCUSSION. — Intranasal infusions of flavoured solutions to ovine fetuses induced FHR variations. The most dramatic effect was recorded following MT infusions: reliable FHR decelerations were observed for that odorant in both fetuses. No significant FHR variations were obtained in either subject after injections of the control stimulus (SP). The infusions of SP being ineffective in triggering FHR changes, the effect of intranasal somesthesia potentially associated with injections can be excluded. In addition, the fact that stimulations were administered through the nasal route allows to rule out FHR changes potentially elicited by the laryngeal chemoreflex [11].

In the present experimental conditions, the unclear effect of CI on the FHR was unexpected in regard of its unquestionable detection by perinatal rats ([1], [12]) and neonatal lambs (Schaal and Orgeur, 1990, unpublished). The differential effectiveness of both odorants could be explained by several factors: (1) although we attempted to subjectively balance their intensity on the basis of the vapor phase, the liquid phases contacting directly the receptors might have been uneven; such an intensive disparity could in itself explain different sensory consequences of the two stimulations; (2) both compounds are not water-soluble at the same

degree [13], a physicochemical property accounting partially for the detection of odorants [14]; (3) the odorous infusions might have recruited receptors belonging to one or several chemoreceptor subsystems present in the nasal pathways (*e.g.*, olfactory, trigeminal, vomeronasal, terminal systems). Specifically, as it is known in other species [15], the most intense stimulus might have depolarised receptors of the olfactory plus trigeminal subsystems and induced FHR changes of larger magnitude. Finally, (4) a hedonic difference between both odorants might produce differential responses in ovine perinates. In less-than-1-hour old lambs, the presentation of two qualitatively distinct odours induced heart rate variations in opposite directions [16]. Thus the possibility of selective odour responsiveness cannot be rejected several hours before birth.

It is clear that many more experiments (using stimuli less contrasted for their physicochemical properties and procedures avoiding the potential effects of repetitive stimulations) are needed to untangle these issues. However, the present results are, to our knowledge, the first to demonstrate functional nasal chemoreception in the ovine fetus. Nasal chemoreceptive abilities first demonstrated in the fetuses of murine rodents might thus be extended to the fetuses of other taxa of placental Mammals.

---

Des expériences récentes montrent que le fœtus de Rongeur perçoit les variations chimiques de l'environnement amniotique. D'une part, une simple exposition prénatale à un stimulus odorant artificiel peut induire, chez le raton et le souriceau nouveau-nés, une préférence ([1], [2]) ou une moindre néophobie [3], pour un substrat de mêmes caractéristiques aromatiques. D'autre part, l'établissement *in utero* d'une aversion chimiosensorielle conditionnée se traduit, au sevrage, par une aversion pour l'ingestion d'un liquide présentant les mêmes propriétés que le stimulus conditionnel fœtal ([4], [5]). La présente étude a pour but de mettre en évidence la généralité du fonctionnement chimiosensoriel chez le fœtus d'une espèce placentaire appartenant à un taxon autre que celui des Rongeurs.

**MÉTHODES.** — *Sujets.* — Cette étude est menée sur deux fœtus ovins de race « Ile-de-France » (F 1: mâle; F 2: femelle) en fin de gestation (jour G 144).

*Chirurgie et équipement des fœtus.* — Après anesthésie de la brebis, les fœtus sont partiellement extraits de l'utérus et de la poche amniotique, en vue de l'implantation intranasale de trois cathéters (polyéthylène, diamètre int. : 0,86 mm; longueur : 80 cm) servant de vecteurs aux stimulations. L'embout des cathéters est positionné à proximité immédiate de la muqueuse olfactive (vérifié après dissection sur des agneaux mort-nés).

Le RCF est capté à l'aide de trois électrodes d'argent (diamètre : 0,4 mm) suturées sous la peau en position ventrale, de part et d'autre du sternum pour les capteurs actifs, et au niveau de la nuque, pour le capteur de référence. Les fœtus ainsi équipés sont réintroduits dans leurs enveloppes qui sont soigneusement refermées. Les cathéters et les fils conducteurs sont fixés au fœtus et à la mère, leur extrémité distale émergeant sur le flanc de la brebis. Les tests de détection chimiosensorielle commencent 1 h après la récupération complète de l'anesthésie maternelle; la brebis se tient alors debout, sans contrainte, pendant la durée de l'expérience. A la fin de celle-ci, les agneaux sont délivrés par césarienne et laissés auprès de leur mère.

*Stimulations chimiques.* — Les injections de stimulations odorantes se font après connexion de l'embout distal des cathéters à une seringue (1 ml) activée manuellement. Trois types de stimulations sont utilisés : (a) du sérum physiologique (SP) (NaCl à 0,9 %

dans de l'eau distillée), (b) du citral (CI) (Aldrich) à concentration saturante (1,7 %, [6]) dans du SP, (c) de la 2-méthyl-2-thiazoline (MT) (Aldrich) à 10 % dans du SP. Les solutions sont injectées à la température fœtale et avec une pression régulière (un même expérimentateur entraîné effectuant les injections). Les stimulations odorantes (CI et MT) sont injectées dans la narine gauche, les stimulations contrôles (SP) dans la narine opposée. L'ordre des injections est le même chez les deux fœtus (I-SP-MT). Un total de 6 et 10 injections consécutives par substance est réalisé chez les fœtus 1 et 2, respectivement. Le volume de chaque injection est de 100  $\mu$ l et sa durée est d'environ 2 s. Entre les deux séries d'injections odorantes (CI et MT), un volume équivalent de liquide est aspiré du canal nasal à l'aide d'une seringue afin de limiter la possibilité de surpression et d'éliminer une partie de la première odeur. Le délai entre deux injections varie en fonction du retour du rythme cardiaque du fœtus aux valeurs notées durant la phase préstimulus. Il n'est jamais inférieur à 120 s. Les stimulations sont délivrées pendant des périodes de faible variabilité du rythme cardiaque en l'absence de toute activité motrice fœtale et maternelle. De plus, le RCF étant soumis à des variations cycliques diurnes [7], les expériences sont effectuées durant des horaires identiques pour les deux fœtus.

*Variables mesurées.* — L'amplification et l'enregistrement en temps réel des variations de la fréquence cardiaque sont réalisés à l'aide d'un électrocardiographe (Hewlett-Packard 8020 A) qui émet un signal électronique TTL à chaque battement. Ces signaux sont envoyés vers un micro-ordinateur (Compaq SLT/286) qui calcule les intervalles interbattements (mesurés en millisecondes) pour chaque séquence expérimentale. Ces intervalles sont convertis en fréquence [battements par minute (bpm)] et traités par un algorithme qui corrige les erreurs de repérage de l'électrocardiographe. Le RCF est enregistré 30 s avant (phase préstimulus) et 60 s après (phase poststimulus) le début de l'injection. Le traitement des données porte sur les données moyennées (bpm) par périodes successives de 3 s; on compare le RCF moyen de la dernière période de 3 s de la phase préstimulus aux 10 premières périodes de la phase poststimulus. Les données de chaque fœtus ont été traitées à l'aide d'analyses de variance à deux facteurs [facteur injection (trois modalités) et facteur période (deux modalités)]. Étant donné que la condition de circularité n'est pas vérifiée pour de telles mesures physiologiques [8], nous n'avons réalisé que des comparaisons à deux termes ( $ddl = 1$ ).

**RÉSULTATS.** — Le niveau moyen du RCF préstimulus est de  $165,1 \pm 11,3$  bpm chez F 1 (valeurs extrêmes : 144,6-196,4 bpm) et de  $171,8 \pm 4,6$  bpm chez F 2 (valeurs extrêmes : 164,1-178,0 bpm), niveaux identiques à ceux d'autres études effectuées au même âge gestationnel ([9], [10]).

Chaque injection de MT provoque une décélération transitoire du RCF. L'amplitude maximale de ces décélérations varie de 3,3 à 53,1 bpm après un délai de 2 à 9 s chez F 1, et de 3,8 à 16,4 bpm après un délai de 5 à 15 s chez F 2. L'amplitude maximale moyenne de la décélération est de 12 et de 8 bpm et elle est atteinte après un délai de 6 et 9 s chez F 1 et F 2, respectivement (*fig.*). Les comparaisons globales entre le niveau préstimulus du RCF et les niveaux poststimulus indiquent un changement significatif du RCF chez les deux fœtus [F 1 :  $F(1, 150) = 5,34$ ;  $p < 0,05$ ; F 2 :  $F(1, 260) = 31,72$ ;  $p < 0,001$ ]. La décélération du RCF est statistiquement significative ( $p < 0,01$ ) entre 3 et 9 s après le début de la stimulation chez F 1 et entre 6 et 30 s chez F 2.

En ce qui concerne les injections de CI, les comparaisons globales entre le niveau préstimulus du RCF et les niveaux poststimulus indiquent une tendance accélératrice chez F 1 [ $F(1, 150) = 3,18$ ;  $0,10 > p > 0,05$ ] et l'absence d'effet chez F 2 [ $F(1, 260) = 0,72$ ;

$p > 0,10$ ]. Enfin, les injections de SP n'ont pas d'effet [pour F 1 :  $F(1, 150) = 0,58$ ; pour F 2 :  $F(1, 260) = 1,82$ ;  $ps > 0,10$ ].

DISCUSSION. — Ces résultats indiquent que des fœtus ovins de fin de gestation éprouvés *in utero* réagissent à des stimulations chimiosensorielles administrées par voie nasale. Des décélérations cardiaques rapides et marquées sont induites par les infusions de MT. Les infusions contrôles (SP) ne provoquent pas d'effet sur le RCF. Ceci suggère que les réponses cardiaques observées sont dues à des effets chimiosensoriels et non à des effets somesthésiques potentiellement associés aux injections de solutions odorantes. De plus, il est à noter que l'injection des stimulations par voie nasale présente l'avantage de ne pas déclencher les réflexes cardio-vasculaires ayant pour origine les chimiorécepteurs du larynx [11].

On peut s'interroger à propos de l'absence d'effet notable des injections de CI dans les conditions de cette expérience. Dans d'autres études menées sur le fœtus de rat ([1], [12]) ou l'agneau nouveau-né (Schaal et Orgeur, non publié), le CI pur est pourtant détecté à des concentrations égales ou inférieures à celle que nous avons utilisée. Plusieurs hypothèses peuvent rendre compte des effets différentiels des solutions odorantes utilisées : (1) Bien que l'intensité des stimulations ait été subjectivement égalisée sur la base de la phase vapeur des solutions, l'intensité des phases liquides entrant en contact direct avec les chimiorécepteurs est probablement différente. Cette disparité intensive pourrait, à elle seule, être responsable des effets distincts des deux stimulations odorantes, la solution la plus concentrée induisant des effets cardiaques plus importants; (2) De plus, les deux composés utilisés ne sont pas équivalents au plan de l'hydrophilicité (pour MT :  $P = 4,15$ ; pour CI :  $166 < P < 260$ , où  $P$  est le coefficient calculé de partage octanol/eau [13]), propriété qui conditionne fortement les interactions entre molécules odorantes et chémorécepteurs [14]; (3) Les infusions odorantes ont pu évoquer des réactions cardiaques à travers le recrutement d'un ou plusieurs des sous-systèmes chimiorécepteurs présents dans les conduits nasaux (systèmes olfactif primaire, trigéminal, voméronasal, terminal) du fœtus. En particulier, comme chez d'autres espèces [15], une stimulation plus intense pourrait dépolariser simultanément les récepteurs olfactifs et trigéminaux. L'analyse de la part dévolue à chacun de ces systèmes récepteurs dans le déclenchement des réponses cardiaques n'entre pas dans le projet de cette expérience; cependant, par comparaison avec le fœtus de rat, le fœtus ovin présente l'avantage d'un accès aisé aux différents sites chimiorécepteurs nasaux et il s'avère prometteur pour la résolution de cette question; enfin, (4) des différences hédoniques entre les deux odorants peuvent induire des réponses psychophysiologiques distinctes. Ainsi, des agneaux (de moins de 1 h d'âge) répondent par des variations opposées du rythme cardiaque à des qualités olfactives distinctes d'intensité égale [16]. Il n'est donc pas à exclure que, quelques heures avant la naissance, le fœtus ovin puisse manifester des réponses sélectives envers des odorants contrastés au plan hédonique.

Pour éclaircir ces différents points, il est nécessaire de conduire de nouvelles expériences avec les stimulations moins contrastées au plan physico-chimique et avec un protocole évitant les effets possibles de la répétition des stimulations. Cependant, ces résultats sont, à notre connaissance, les premiers à démontrer directement le fonctionnement des chimiorécepteurs nasaux chez le fœtus ovin. Il semble donc que la compétence chimiosensorielle nasale, maintenant bien établie chez les fœtus de muridés, puisse être élargie aux fœtus d'autres taxons mammaliens.



Nous remercions F. Paulmier et le personnel de l'Hôpital de la Station de Physiologie de la Reproduction (I.N.R.A., Nouzilly) pour la partie chirurgicale de l'expérience, Y. Barbin et C. Kervella pour la réalisation des programmes de traitement des données, C. Kervella, B. Hars, C. Rognon et A. Y. Jacquet pour leur concours technique, P. Perruchet pour ses conseils statistiques, E. Hertling, R. Nowak et J. P. Signoret pour leur aide efficace. Cette recherche est financée par le contrat n° 89G0388 du Ministère de la Recherche et de la Technologie et la subvention n° 0366/87 de la Division des Affaires scientifiques de l'O.T.A.N., Bruxelles.

Pour les demandes de tirages-à-part s'adresser à B. Schaal.

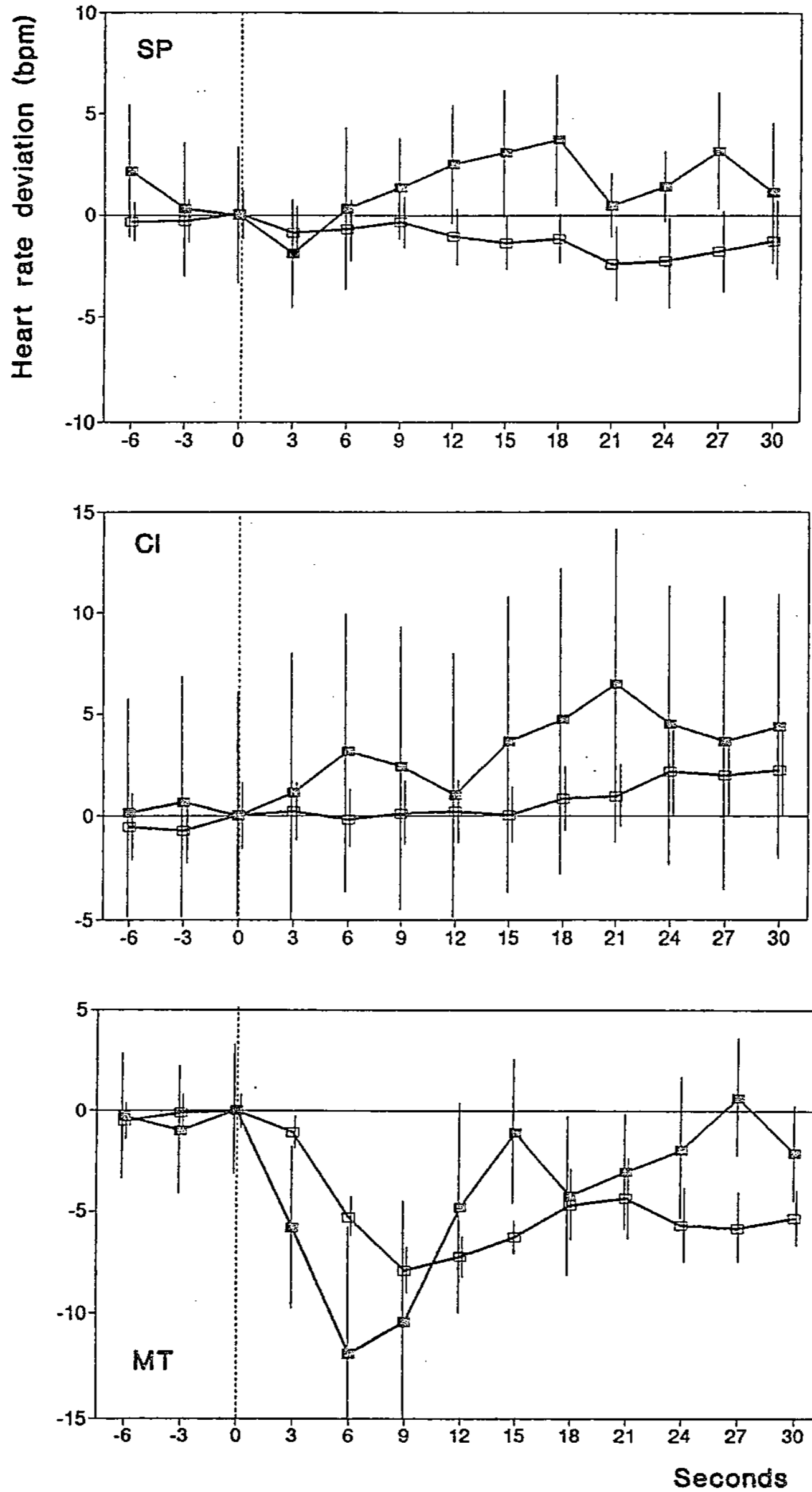
Note remise le 26 juin 1991, acceptée le 13 août 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] P. E. PEDERSEN et E. M. BLASS, *Devel. Psychobiol.*, 15, 1982, p. 349-356.
- [2] W. P. SMOTHERMAN, *Behav. Neural Biol.*, 36, 1982, p. 61-68.
- [3] N. KODAMA, Communication, *IXth Cong. Intern. Soc. Study Behav. Devel.*, Tokyo, juillet 1987.
- [4] W. P. SMOTHERMAN, *Physiol. Behav.*, 29, 1982, p. 769-771.
- [5] G. STICKROD, D. P. KIMBLE et W. P. SMOTHERMAN, *Physiol. Behav.*, 28, 1982, p. 5-7.
- [6] S. BUDAVARI et coll. éd., *The Merck Index*, Merck & Co, Rahway, N.J., 1989.
- [7] K. J. DALTON, G. S. DAWES et J. E. PATRICK, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 127, 1977, p. 4114-424.
- [8] R. G. O'BRIEN et M. K. KAISER, *Psychol. Bull.*, 97, 1985, 316-333.
- [9] Y. DONCHIN, D. CATON et S. W. PORGES, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 148, 1984, p. 1130-1135.
- [10] B. L. LANGILLE, R. D. BROWNLEE et S. L. ADAMSON, *Am. J. Physiol.*, 259, 1990, H 1247-H 1253.
- [11] J. GROGGARD, D. P. LINDSTROM, M. T. STAHLMAN, F. MARCHAL et H. SUNDELL, *J. Dev. Physiol.*, 4, 1982, p. 352-370.
- [12] W. P. SMOTHERMAN et S. R. ROBINSON, *Physiol. Behav.*, 47, 1990, p. 863-868.
- [13] G. G. NYS et R. F. REKKER, *Eur. J. Med. Chem.*, 9, 1974, p. 361-375.
- [14] D. E. HORNUNG, S. L. YOUNGTOB et M. M. MOZELL, *Brain Res.*, 413, 1987, p. 147-154.
- [15] W. S. CAIN et C. L. MURPHY, *Nature*, 284, 1980, p. 255-257.
- [16] M. A. VINCE et T. M. WARD, *Behaviour*, 89, 1984, p. 117-127.

B. S., J.-P. L. et C. G.-D. : *Laboratoire de Psychobiologie de l'Enfant, E.P.H.E.-C.N.R.S. (U.R.A. n° 315), 41, rue Gay-Lussac, 75005 Paris;*

P. O., A. L. et P. P. : *Laboratoire de Comportement animal, Station de Physiologie de la Reproduction, I.N.R.A.-C.N.R.S. (U.R.A. n° 1291), 37380 Nouzilly.*



Évolution en fonction du temps de la déviation poststimulus du RCF moyen (les barres verticales représentent les erreurs standards) en battements par minute (bpm) pour deux fœtus (F1 : carrés pleins; F2 : carrés blancs) après infusions intranasales de sérum physiologique (SP), de citral (CI) et de 2-méthyl-2-thiazoline (MT). Chaque point représente la différence entre la moyenne des valeurs du RCF calculée sur chaque période poststimulus de 3 s et la moyenne des valeurs du RCF calculée sur les 3 dernières secondes de la phase préstimulus (les injections intranasales commencent au temps 0; nombre d'injections pour chaque condition, chez F1, n=6; chez F2, n=10).

*FHR deviation from prestimulus value (mean ± S.E.M.) of two sheep fetuses (F1: solid squares; F2: empty squares) receiving intranasal infusions of saline (SP), citral (CI) and 2-methyl-2-thiazoline (MT). Each point represents the difference between the average FHR of each poststimulus 3-sec. period (infusions were initiated at time 0; n stimulations in each condition: n=6 for F1; n=10 for F2).*



## The electrophysiology of cytoplasm-enriched fragments of *Nitella*: effect of vacuole formation and nodal conductance

Mary J. BEILBY and Virginia A. SHEPHERD

**Abstract** — The cytoplasm-enriched fragments made from *Nitella furcata* develop normal vacuoles several days after manufacture. In this paper the electrophysiology of the plasmalemma was monitored throughout this period. The I/V curves of the plasmalemma seemed unaffected by the presence or absence of central vacuole. The absence of a node, however, diminished the magnitude of the outward rectifier. Thus plasmodesmata might contribute to the electrophysiology of the cell. The fragments with and without vacuoles had a very limited excitation.

### Electrophysiologie de fragments enrichis en cytoplasme de cellules de *Nitella*: effet de la formation d'une vacuole et de la conductance du nœud

**Résumé** — Les fragments enrichis en cytoplasme de *Nitella furcata* reforment des vacuoles normales dans les quelques jours qui suivent leur préparation. On a suivi l'électrophysiologie du plasmalemma pendant toute cette période. Les courbes I/V du plasmalemma ne semblent pas être significativement affectées par la présence ou l'absence d'une vacuole centrale. En l'absence de nœud, l'effet de rectification (courant sortant) était cependant diminué. Ceci suggère que les plasmodesmes pourraient jouer un rôle dans l'électrophysiologie de la cellule. En présence comme en l'absence de vacuoles, les fragments cellulaires ne présentaient qu'une très faible excitabilité.

**Version française abrégée** — Initialement, des fragments cellulaires enrichis en cytoplasme ont été préparés à partir de *Nitella* dans le but de faciliter les mesures électrophysiologiques par simplification de la compartimentation [1]. Cependant, l'étude structurale de ces fragments a révélé la présence de vésicules dans le cytoplasme, et une vacuole centrale s'est reformée, parfois en quelques heures seulement ([2], [3]). Ceci toutefois ne rendait pas ces fragments impropres aux études électrophysiologiques : la couche cytoplasmique restait plus épaisse dans les fragments pendant plusieurs jours, ce qui rendait l'insertion de microélectrodes plus aisée que dans les cellules intactes. Cependant, on ne savait pas si ces modifications structurales affectaient l'électrophysiologie du plasmalemma, ce qui aurait été une cause d'inhomogénéité dans une population de fragments d'âges différents. Le présent travail a consisté à suivre l'évolution des caractéristiques électrophysiologiques du plasmalemma des fragments pendant la semaine suivant leur préparation, temps au bout duquel ces fragments possédaient de nouvelles vacuoles dont le comportement était devenu analogue à celui des vacuoles de cellules intactes suite à l'injection de 6-carboxyfluoresceine dans le cytoplasme [3].

Les fragments ont été préparés à partir de cellules internodales de *Nitella furcata* de 10 cm de long environ comme décrit antérieurement [3] : centrifugation à 1 g pendant 20 mn, puis ligature de la partie de la cellule où le cytoplasme s'était accumulé à l'aide d'un fil de soie. Des fragments cellulaires dépourvus de nœud étaient également préparés en ligaturant le nœud avant de procéder aux opérations précédentes. Des fragments ligaturés mais non centrifugés étaient préparés. Les mesures électrophysiologiques ont été faites en même temps que les observations structurales pendant le printemps et l'été. Dans la plupart des essais, les cellules et les fragments ont été maintenus dans une eau de mare artificielle dont le pH était ajusté à 7,5. L'appareillage électrophysiologique a déjà été décrit ([2], [4], [5]). En résumant brièvement, on opère en contrôlant le potentiel sur toute la surface de la cellule étudiée. Les mesures de potentiel et de courant sont digitalisées par un ordinateur « LSI 11/73 » (Digital

Note présentée par Michel THELLIER.

Corporation) à une fréquence de 1 kHz. Elles sont ensuite stockées sur disque dur. Les potentiels imposés à la cellule sont pilotés par le calculateur. Ils sont constitués par des impulsions de tension de chaque polarité (durée de l'impulsion 60 ms, intervalle entre deux impulsions 200 ms), suivies par une période de plusieurs secondes pendant laquelle on superpose une tension sinusoïdale à un niveau constant. Cette période est précédée et suivie de périodes pendant lesquelles le potentiel est fixé à sa valeur de repos. Un premier type de commande en tension fournit des courbes intensité/potentiel (I/V); celles-ci sont lissées par des approximations polynomiales que l'on différencie pour obtenir des courbes conductance/potentiel (G/V). Un second type de commande en tension est utilisé pour étudier la réponse à des régimes transitoires (réponse à une excitation) : l'impédance est calculée à partir des mesures de l'amplitude et du déphasage de la réponse par rapport à une excitation sinusoïdale.

L'électrophysiologie de *Nitella furcata* n'avait encore jamais été étudiée. Par comparaison avec *Chara corallina* [6], le potentiel de repos apparaît très négatif ( $-158 \pm 12$  mV) et les courants sont faibles au voisinage de ce potentiel. Pour d'autres espèces de *Nitella*, on trouve toute une gamme de valeurs de potentiels de repos ([7], [8], [9]). Les courbes I/V obtenues avec *Nitella furcata* sont semblables à celles trouvées avec d'autres characées, mais la conduction devient notable pour les potentiels moins négatifs (courants entrants) ou moins positifs (courants sortants) que pour les autres characées [10]. Les courbes I/V ou G/V ne semblent pas très différentes selon que les fragments viennent d'être préparés ou qu'ils sont âgés de 1 semaine : ceci suggère que la formation des vacuoles n'est pas associée à une notable modification du plasmalemme (fig. 1). Avec des fragments où la participation des extrémités nodales a été exclue par ligature, les courants sortants sont d'amplitude plus faible, ce qui suggère que les plasmodesmes pourraient contribuer à l'électrophysiologie cellulaire [11]. L'excitabilité des fragments étudiés était assez faible, et il en était de même avec les fragments non centrifugés qui contenaient des vacuoles normales (fig. 2).

---

INTRODUCTION. — The cytoplasm-enriched fragments were initially devised to make electrophysiological measurements easier by simplifying the cell compartments [1]. However, structural examination revealed numerous vesicles throughout the cytoplasm and formation of a central vacuole, in some cases only hours after manufacture ([2], [3]). From a mechanistic point of view these findings did not make the fragments unusable for electrophysiology. The cytoplasmic layer remained thicker in the fragments for many days and the positioning of the microelectrodes was still much easier than in intact cells. However, it was not known whether the structural changes affect the electrophysiology of the plasmalemma, thus introducing inhomogeneity into a population of fragments of varying ages. In this study we monitor the electrophysiology of the plasmalemma as the fragments evolve with time.

MATERIALS AND METHODS. — The fragments were made from *Nitella furcata* internodal cells as described in the previous paper [3]. Briefly, internodal cells about 10 cm long were centrifuged at  $\sim 1$  g, for 20 min. The cells were then wilted and the cytoplasm rich portion tied off with a silk thread. To prepare nodeless fragments, the intact cell was wilted and the first node tied off. Upon recovery, as judged from streaming rate (sometimes the cells were left overnight), the cells were centrifuged as with the node-on fragments. The uncentrifuged fragments were prepared by wilting the internodal cells

and then ligating a portion of several millimeters and the node complex. Such fragments had normal vacuoles as judged from neutral red staining [2].

The electrophysiological experiments were performed mostly in parallel with the structural observations: September 1989 and January to February 1990 (Australian spring and summer, respectively). A few additional experiments were performed in September 1990.

For most experiments the cells and fragments were stored in artificial pond water (APW), which consisted of 0.1 mM KCl, 1 mM NaCl, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM HEPES and NaOH to adjust pH to 7.5.

The electrophysiological apparatus was described previously ([2], [4], [5]). The fragments were space-clamped via Pt/Ir wire inserted through the node, or next to the tie in nodeless fragments. The manufacture of unspun fragments enabled us to space-clamp the plasmalemma, as the leaf cells of *Nitella furcata* were too thin for longitudinal wire electrode insertion.

The potential across the plasmalemma was controlled through voltage clamp. The clamp potential and the clamp current were data-logged at a rate of 1 data point/msec. by LSI 11/73 computer (Digital Corporation). This computer also generated two types of voltage-clamp commands: (1) a bipolar staircase with pulses 60 msec. wide, 200 msec. between pulses, and (2) single level clamp with small superimposed sinewave, usually preceded and followed by a clamp to the resting potential. In both types of experiments the conductance of the plasmalemma could be calculated. The bipolar staircase yielded current-voltage (I/V) curves by averaging the last ten points of each potential and current pulse. The conductance-voltage (G/V) characteristics were obtained by fitting a polynomial to I/V curve (three points at a time) and differentiating. The clamping protocol of type (2) was used to investigate transient phenomena such as excitation. A sine wave of 5 Hz, 10-20 mV in amplitude, was superimposed on this command. The conductance, or more correctly impedance, was calculated by comparing the amplitudes and phase difference between the p. d. trace and the clamp current trace [4].

RESULTS AND DISCUSSION. — The average current-voltage (I/V) characteristics of three *Nitella* fragments with one node are shown in Figure 1 A (full circles). These range from a freshly made fragment to one made the day before and one which was over a week old. The average I/V curve from two nodeless fragments is superimposed (empty circles), also one example from ligated, but not spun fragment is included (broken line). The corresponding conductance-voltage (G/V) characteristics appear in Figure 1 B.

The clamp command to a single p. d. level with superimposed sine wave was used to investigate the excitation transients. Interestingly, both the cytoplasm-enriched and unspun fragments showed very limited excitation (Fig. 2).

The electrophysiology of *Nitella furcata* was not examined before. The average resting p. d. of  $-150 \pm 12$  mV is rather low compared to *Chara corallina*, especially since most of the experiments were done in the summer and the cells are expected to be in the pump state (see for instance [6]). However, a wide range of resting p. d.'s was reported for various species of *Nitella*: 138-157 mV for  $E_{vac}$  of *N. flexilis* [7];  $-94$  mV for *N. axillaris* [8]; or  $-170$  mV for *N. clavata* [9].

The general trends of the I/V and G/V profiles are comparable to other characeae, but the currents and the conductances near the resting potential are rather low. Another interesting feature is the sharp rise of inward and outward rectifiers at comparatively less negative (inward) and less positive (outward) p. d.'s (compare with *Chara* fragments [10]).

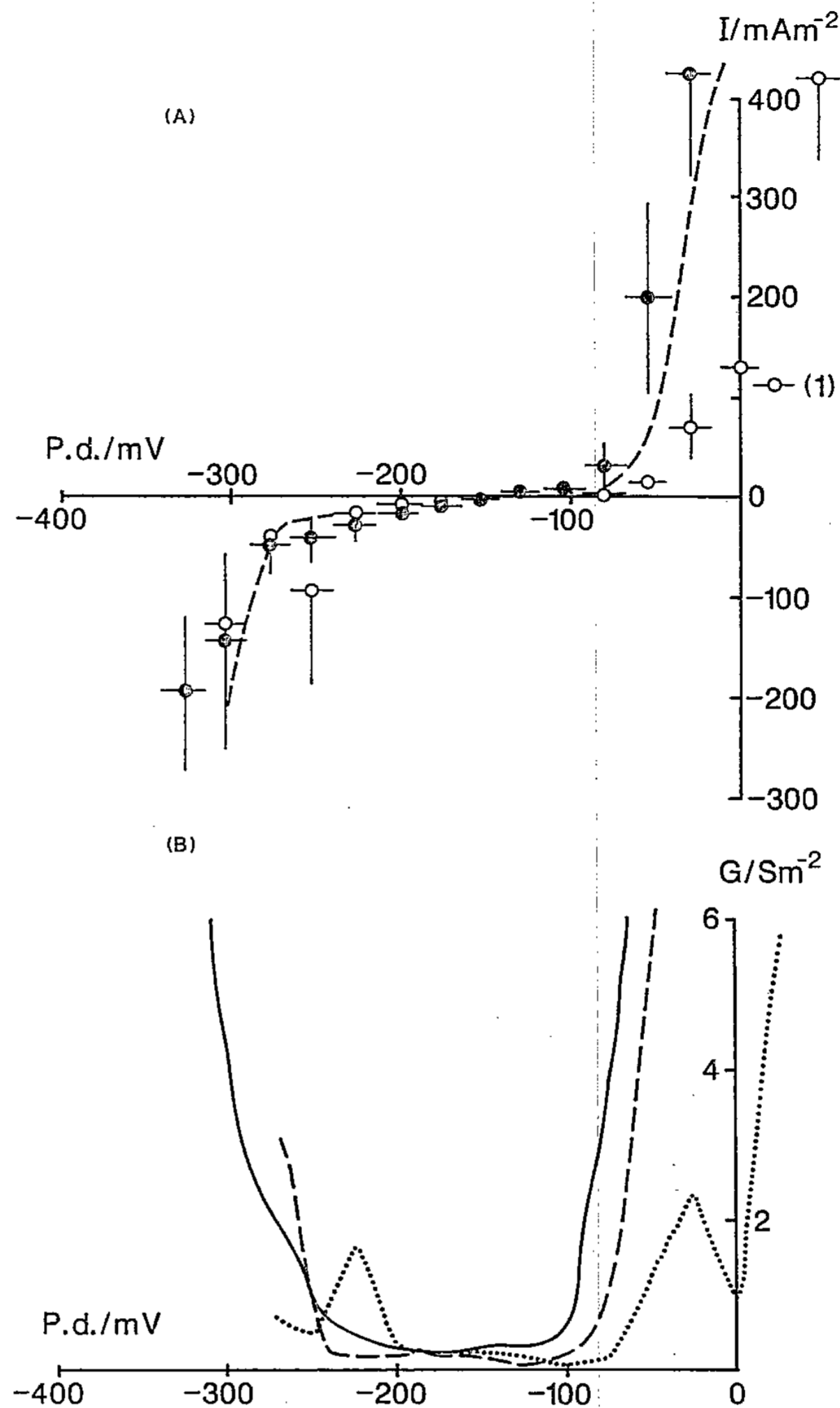


Fig. 1. — (A) An average of eight current-voltage ( $I/V$ ) curves from three fragments with a node on ( $\bullet$ ). The data were grouped into bins 25 mV wide (horizontal bars) and the vertical bars depict standard error. An average of five  $I/V$  curves from two fragments without nodes ( $\circ$ ). The dashed line shows data from a unspun fragment (with one node). (B) The conductances-voltage ( $G/V$ ) curves calculated from (A), see methods. — one node fragments, ..... nodeless fragments, - - - - - ligated, but unspun fragment.

Fig. 1. — (A) Moyennes de huit courbes courant/potentiel ( $I/V$ ) obtenues à partir de trois fragments cellulaires porteurs d'un nœud ( $\bullet$ ), et moyennes de cinq courbes  $I/V$  provenant de deux fragments dépourvus de nœuds ( $\circ$ ) : les données ont été regroupées en blocs de 25 mV de large (barres horizontales), les barres verticales correspondant à l'erreur standard. La courbe en tirets donne le comportement d'un fragment non centrifugé porteur d'un nœud. (B) Courbes conductance/potentiel ( $G/V$ ) calculées à partir des données décrites en A comme indiqué dans les méthodes : la courbe en trait plein correspond à des fragments porteurs d'un nœud, celle en pointillé à des fragments dépourvus de nœud, et celle en tirets à des fragments ligaturés mais non centrifugés.

Note also that the nodeless fragments display lower outward currents. Smith [11] calculated that if nodal conductance contributes to the total plasmalemma conductance, this effect would be most visible if the plasmalemma conductance is low. In Figure 1, however, the greatest difference between node-on and nodeless fragments occurs at depolarized p.d.'s, where the plasmalemma becomes conductive due to the rectifier

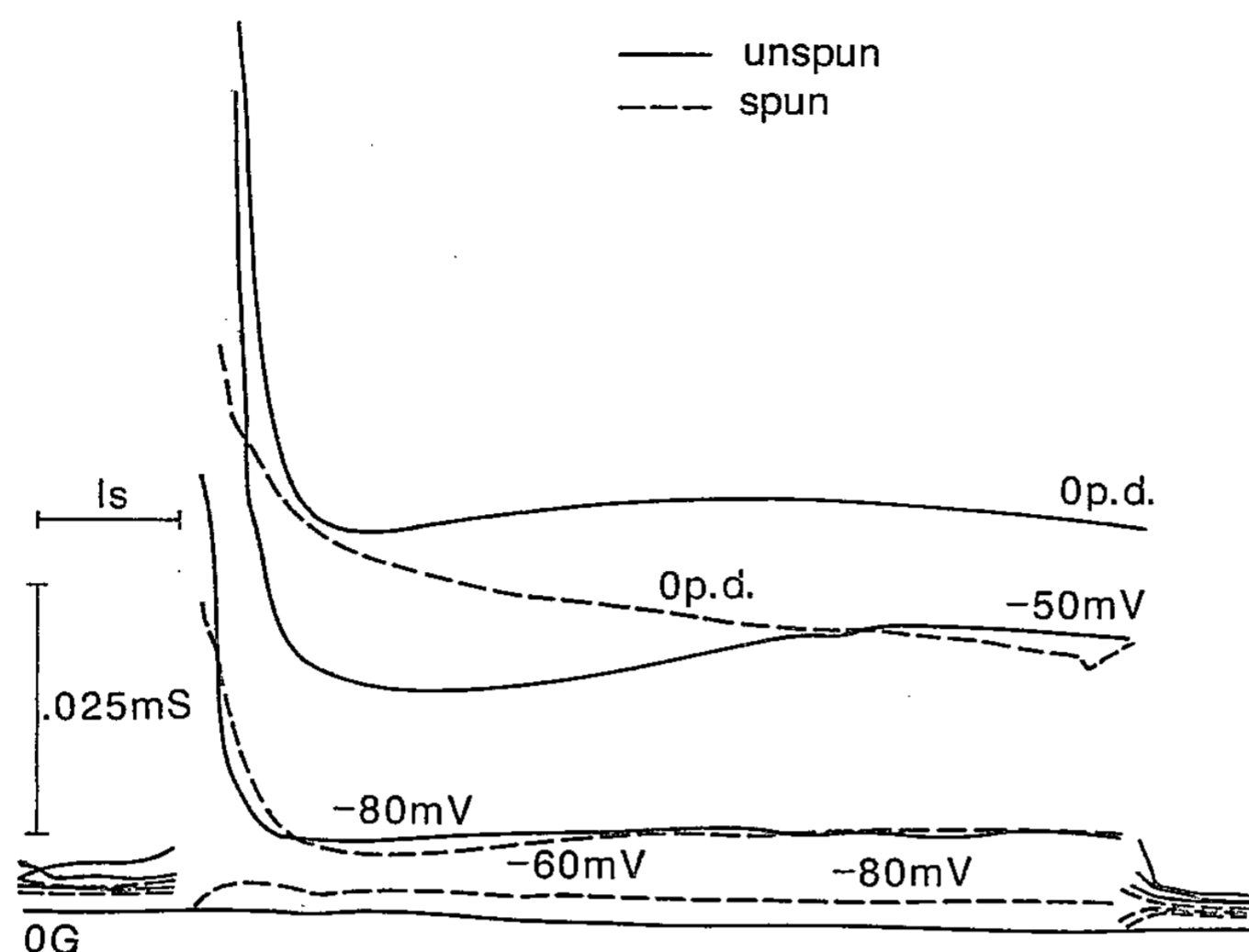


Fig. 2. — The low level of excitability displayed by both spun (-----) and unspun (——) fragments. The membrane was voltage-clamped to resting p.d. for 1 sec., then to levels indicated next to each curve for 5 sec. and finally to resting p.d. for 1 sec. The conductance was calculated as described in Beilby and Beilby (1983) [4].

Fig. 2. — Le faible niveau d'excitabilité des fragments centrifugés (en tirets) comme non centrifugés (en trait plein). La membrane était maintenue en potentiel imposé, d'abord au potentiel de repos pendant 1 s, puis au potentiel indiqué au niveau de chaque courbe pendant 5 s, et enfin de nouveau au potentiel de repos pendant 1 s. La conductance a été calculée comme indiqué antérieurement [4].

currents. If the plasmodesmata contribute, then their conductance must be p.d.-dependent. More investigation is needed.

A comparison of unspun fragment (with normal vacuole) to the pooled data from fragments of varying ages suggests that the electrophysiology of the plasmalemma does not vary with the age of the fragment and consequently is relatively insensitive to absence or presence of a central vacuole.

Both the cytoplasm-enriched and spun-only fragments were clamped to potential levels where transient rise in conductance is marked in cells of *Chara corallina* (see for instance Fig. 11 of [4]). In *Chara* fragments, the lack of excitability was attributed to the fact that larger mass of cytoplasm precluded  $Ca^{++}$  concentration from rising sufficiently to open many  $Cl^{-}$  channels [2]. The unspun *Chara* fragments exhibited negative resting potentials (-230 mV), action potentials upon stimulation and transient currents when the membrane p.d. was clamped at levels more positive than the excitation threshold (M. J. Beilby, unpublished). These findings indicate that excitability is not abolished by the process of wilting and ligation of a cell. The lack of excitability in unspun fragments of *Nitella furcata* is difficult to explain at present.

Note remise le 4 juillet 1991, acceptée le 12 juillet 1991.

#### REFERENCES

- [1] C. HIRONO and T. MITSUI, in AG MATSUMOTO and M. KOTANI, Eds., *Nerve Membrane*, Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 1981, pp. 135-149.
- [2] M. J. BEILBY and V. A. SHEPHERD, *Protoplasma*, 148, 1989, pp. 150-163.



- 
- [3] M. J. BEILBY and V. A. SHEPHERD, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 311, Series II, 1990.  
[4] M. J. BEILBY and B. N. BEILBY, *J. Membrane Biol.*, 74, 1983, pp. 229-245.  
[5] M. J. BEILBY, *J. Exp. Bot.*, 41, 1990, pp. 165-182.  
[6] M. J. BEILBY, *J. Membrane Biol.*, 81, 1984, pp. 113-125.  
[7] M. TAZAWA, M. KIKUYAMA and S. NAKAGAWA, *Plant Cell Physiol.*, 16, 1975, pp. 611-622.  
[8] U. KISHIMOTO, *Plant Cell Physiol.*, 7, 1966, pp. 429-439.  
[9] H. KITASATO, *J. Gen. Physiol.*, 52, 1968, pp. 60-87.  
[10] S. R. MCCULLOCH, M. J. BEILBY and N. A. WALKER, *J. Membrane Biol.*, 115, 1990, pp. 129-143.  
[11] J. R. SMITH, *Aust. J. Plant Physiol.*, 12, 1985, pp. 413-21.

---

M. J. B. : *School of Biological Sciences, A 12,  
University of Sydney, NSW 2006, Australia;*

V. A. S. : *Department of Horticulture, School of Crop Sciences,  
University of Sydney, NSW 2006, Australia.*

## Mise en évidence d'un marqueur protéique différenciant deux types de cals issus de mêmes clones chez le Palmier à Huile (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Philippe MARMEY, Isabelle BESSE et Jean-Luc VERDEIL

**Résumé** — La régénération du Palmier à Huile passe par une phase d'embryogenèse somatique où deux types de cals peuvent être utilisés. Un type de cal conduit à une malformation des inflorescences des plantes régénérées, l'autre permet une régénération conforme. Une analyse des profils protéiques par électrophorèse monodimensionnelle permet d'identifier pour trois clones étudiés un marqueur protéique discriminant les deux types de cals.

### A proteic marker found to differentiate two types of calli of the same clones of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

**Abstract** — Regeneration of oil palm plantlets has been achieved through two different types of calli. Arguments have recently been put forward to implicate one of the two types in oil palm inflorescence malformation. A proteic marker can characterize, for three clones, one type of callus after one-dimensional electrophoresis.

**Abridged English Version** — Regeneration of clonal oil palm plantlets has been demonstrated successfully during the past few years through procedure which involved somatic embryogenesis on calli [1]. Two types of calli can lead to embryogenesis (*Fig. 1*): the primary calli (called nodular) and the fast growing calli (called CCR) that arise spontaneously from primary calli [2]. The process of ORSTOM-IRHO involves the nodular calli for the mass production of plantlets whose conformity in the plantation is nowadays checked. However, type CCR, not included in the process, leads to plantlets that all have malformations of the inflorescences [3].

The primary calli are characteristically compact, rather organized and nodular. Calli from type CCR are friable and are in fact clumps of numerous meristematic cells in division ([4], [5]). In this paper, we propose to compare for three clones the proteic patterns of the two types of calli.

**MATERIAL AND METHODS.** — *Plant material.* — Three clones are used: A and C are clones of calli obtained respectively from a normal and abnormal tree, planted in Ivory Coast, regenerated from a nodular callus. B is a callus obtained during the cloning of a normal tree, also planted in Ivory Coast. Cultures of calli, either nodular or CCR, are grown under 12 hours' light at  $40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , on a medium containing an auxin (2-4D) and a cytokinin (BAP) [6]. Maintenance of cultures involves routine of subculture of calli, at six-week intervals for the nodular type and three-week intervals for type CCR. Extraction of proteins takes place two months after separation of the two calli, when CCR calli are big enough.

*Protein extraction.* — The callus is ground into powder in liquid nitrogen in a mortar. The powder is homogenized with a polytron at 4°C in extraction buffer [50 mM Tris/HCl; 10 mM NaCl; 1 mM Dithiothreitol (DTT); 2 mM Phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF)]

Note présentée par Alexis MOYSE.

and then centrifuged at 10,000 g for 30 min. at 4°C; the supernatant is then kept at -20°C. Concentrations of proteins samples are estimated according to Bradford [7].

*One-dimensional electrophoresis of proteins.* — Gels are performed using the modified Laemmli discontinuous buffer system [8], using 15% acrylamide for the analytical portion with a 7% acrylamide stacking gel. High range molecular weight markers (Pharmacia) are used. 20 µg of proteic extracts are load into the gel per well after 5 min. of boiling. Gels are silver stained [9] after migration.

RESULTS. — The two types of calli, with a morphological different aspect (*Fig. 2*), show also differences for the concentration of the soluble proteins; nodular calli are two to four times richer in proteins (Table).

Protein patterns of the two types of calli for clones A, B and C (with migration of two proteic extracts for the clone C) are shown in Figure 3. Two differences are well repeated between nodular and CCR calli patterns. A band at 22.2 kd is observed only in the CCR type pattern. A 21.5 kd band is less important in the patterns corresponding to the CCR type. These results are observed for two other clones.

DISCUSSION. CONCLUSION. — This study reveals a 22.2 kd proteic marker that discriminates the two types of calli. The decrease of intensity of the 21.5 kd is interesting; this could be an equilibrium between the two polypeptides. These results are important because of the great correlation between the type of calli used and the conformity of the regenerated plant.

Studies on calli at the hormonal level show a perturbation of the cytokinin metabolism only for type CCR [10]. The association of our proteic study with hormonal results will help us to know if the presence of the 22.2 kd protein is correlated to the hormonal perturbation and so to the abnormality due to *in vitro* culture.

---

INTRODUCTION. — La régénération du Palmier à Huile à partir d'explants foliaires fait intervenir une phase d'embryogenèse somatique indirecte [1]. Deux types de cals peuvent s'orienter vers l'embryogenèse (*fig. 1*) : des cals nodulaires compacts et des cals appelés cals à croissance rapide (CCR) pouvant apparaître de façon spontanée sur des cals nodulaires [2]. Le type « cal nodulaire » choisi dans le procédé ORSTOM-IRHO permet la production en masse de plants dont la conformité est aujourd'hui vérifiée en plantation alors qu'inversement, le type « CCR », non retenu pour la production en masse de plants, donne des vitroplants qui présentent tous une malformation des inflorescences [3].

Les cals de type CCR, d'une couleur blanchâtre, possèdent une texture plus granuleuse et friable que les cals nodulaires de couleur brunâtre [1]. Des coupes histologiques ont révélé que les cals nodulaires ont une différenciation tissulaire avec une assise méristématique de type cambium alors que les cals de type CCR sont un ensemble de massifs de cellules méristématiques en division ([4], [5]). Dans cette étude, nous nous proposons de comparer sur trois clones les profils protéiques des deux types de cals.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Matériel végétal.* — Trois clones sont étudiés : A et C sont des clones de cals obtenus respectivement sur un individu normal et anormal, planté en Côte-d'Ivoire, régénéré à partir de cals nodulaires. B est un cal obtenu lors du clonage d'un individu normal, lui aussi planté en Côte-d'Ivoire. Les cals, nodulaire ou CCR, sont conservés sous lumière 12 h par jour à 40 µE/m<sup>2</sup>/s, sur un milieu dit d'embryogenèse contenant une auxine (2-4D) et une cytokinine (BAP) [6]. Les cals de type CCR sont

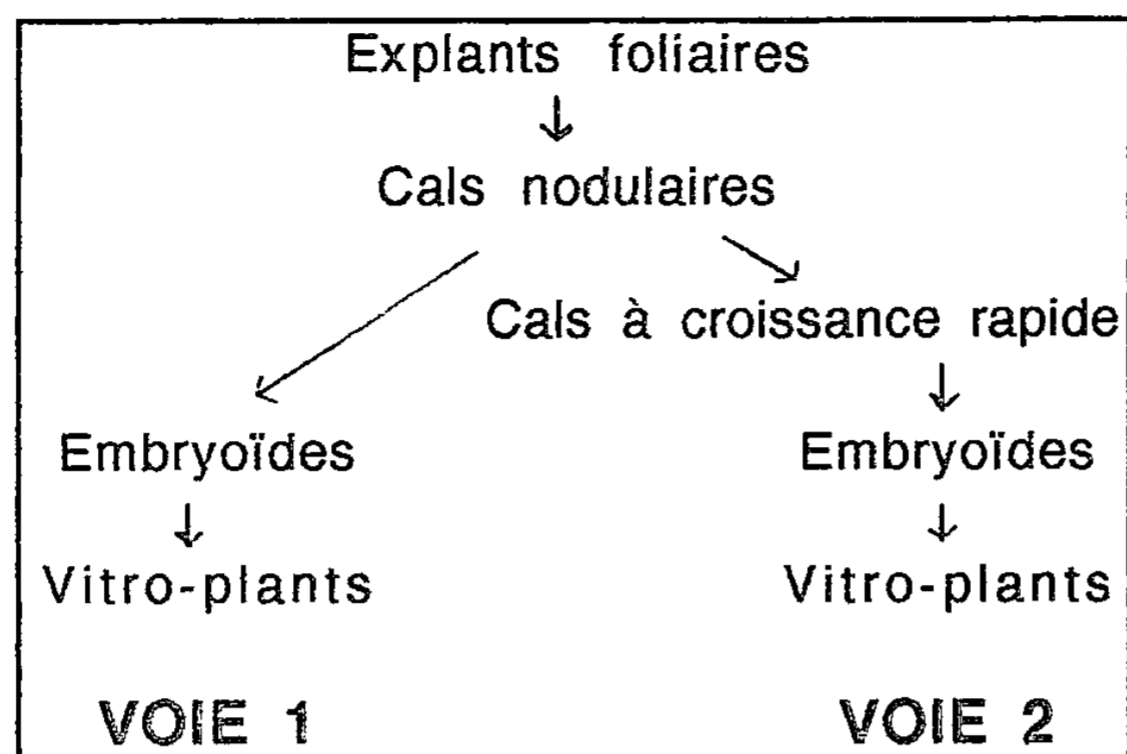


Fig. 1. — Les deux voies de régénération du Palmier à Huile par embryogenèse somatique.

Fig. 1. — The two procedures of regeneration of oil palm tree through somatic embryogenesis.

repiqués tous les mois, deux fois plus souvent que les cals nodulaires. L'extraction des protéines des cals a lieu 2 mois après isolement des deux types de cals, quand les CCR ont une masse suffisamment importante pour une extraction des protéines.

*Extraction et dosage des protéines.* — Le cal est broyé à l'aide d'un mortier dans l'azote liquide, puis homogénéisé avec un polytron à 4°C avec le tampon d'extraction [50 mM Tris/HCl; 10 mM NaCl; 1 mM Dithiothreitol (DTT); 2 mM Phénylméthylsulphonylfluoride (PMSF)]. Le broyat est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 30 mn à 4°C pour ne garder que le surnageant (conservé à -20°C). Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford [7].

*Electrophorèse mono-dimensionnelle de protéines.* — Les gels polyacrylamides mono-dimensionnels utilisés correspondent au système modifié par Laemmli [8]. Le pourcentage d'acrylamide est respectivement de 15 et 7 % pour le gel analytique et le gel de peigne. 20 µg d'extrait protéique sont disposés dans chaque puits après un temps d'ébullition de 5 mn. Les marqueurs de masses moléculaires couvrent la gamme 14,4-94 kd (Pharmacia). Après migration, les gels sont colorés au nitrate d'argent [9], puis fixés 1 h dans une solution aqueuse (45 % méthanol; 9 % acide acétique) puis séchés.

**RÉSULTATS.** — Les deux types de cal, qui ont un aspect morphologique différent (*fig. 2*), présentent également des différences au niveau des protéines solubles. Les résultats montrent que les cals de type nodulaire sont de deux à quatre fois plus riches en protéines que les cals de type CCR (tableau).

La figure 3 présente les profils protéiques des deux types de cals pour différents clones (clones A, B et C) avec pour le clone C migration de deux extraits protéiques pour chaque type de cal. Deux différences sont répétées entre profils des cals nodulaires et profils des cals de type CCR. La bande observée à 22,2 kd est uniquement présente chez les profils protéiques des cals CCR. La bande estimée à 21,5 kd et présente dans les profils de cals nodulaires diminue d'intensité dans les profils des cals de type CCR. Ces deux observations sont vérifiées pour deux autres clones.

**DISCUSSION. CONCLUSION.** — L'étude électrophorétique met en évidence un marqueur protéique d'une masse moléculaire estimée à 22,2 kd discriminant les deux types de cals. La diminution d'intensité d'une bande estimée à 21,5 kd est intéressante car il pourrait s'agir d'un équilibre entre les deux polypeptides cités ci-dessus. Ces résultats deviennent

TABLEAU

Comparaison des concentrations en protéines des deux types de cals pour les trois clones étudiés (concentration en milligrammes de protéines par gramme de matière fraîche de cal). Moyenne de deux répétitions  $\pm$  SE.

*Comparison of proteins concentration of the two types of callus for three clones (concentration in mg of proteins per g of fresh weight of callus). Data are means of two replicates  $\pm$  SE.*

clone type	A	B	C
cal nodulaire	2,71 $\pm$ 0,14	2,66 $\pm$ 0,13	1,55 $\pm$ 0,08
cal type CCR	0,73 $\pm$ 0,04	0,87 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,04

déterminant quand on connaît la forte corrélation entre le type de cal de départ et la conformité des plantes régénérées au niveau des inflorescences.

Les études sur cals des équilibres hormonaux montrent une perturbation du métabolisme des cytokinines uniquement chez les cals de type CCR [10]. La confrontation des

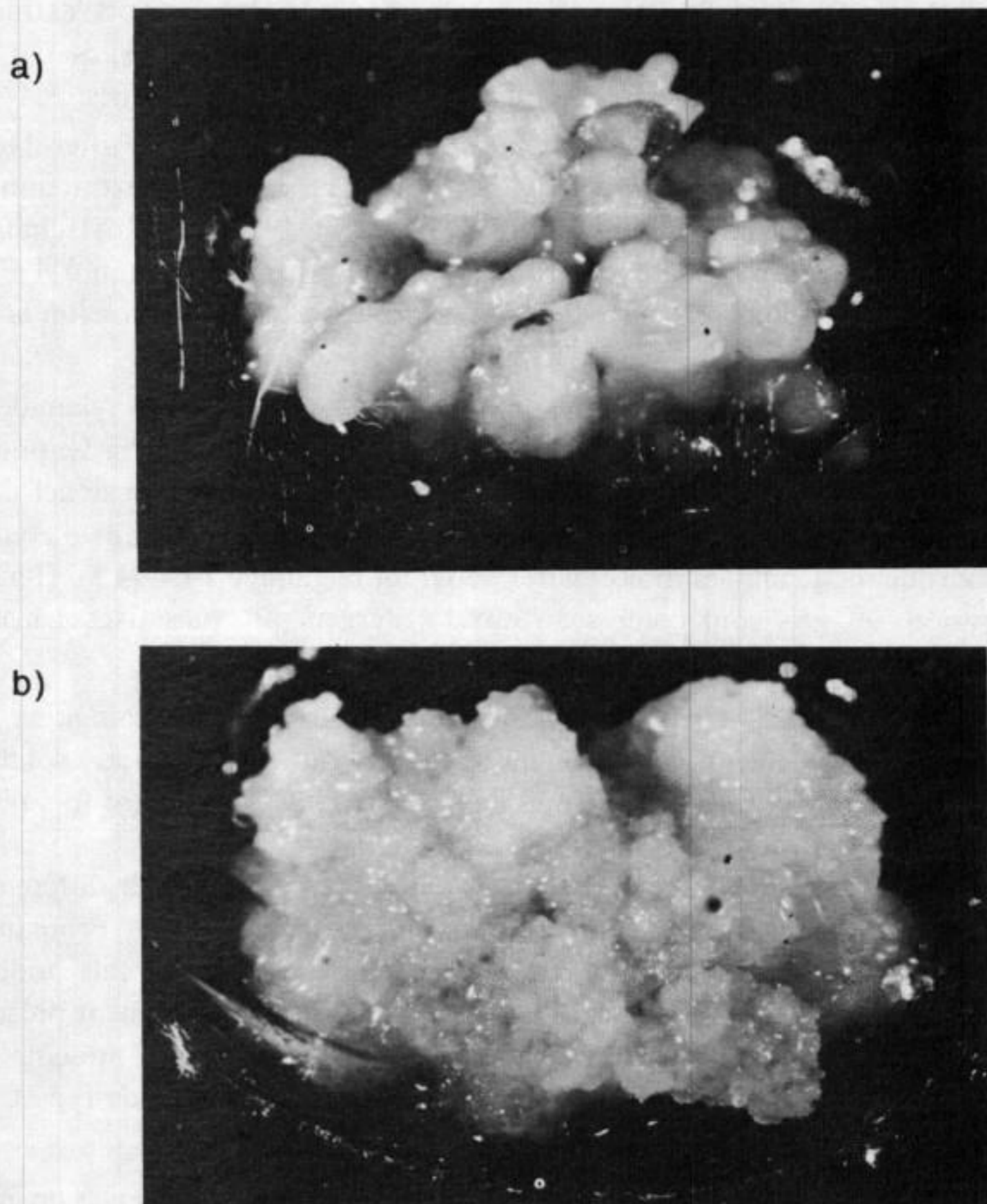


Fig. 2. — Aspect des deux types de cal sur le même milieu de culture  
(a) cal de type nodulaire; (b) cal de type CCR.

*Fig. 2. — View of the two types of callus on the same culture medium (a) Nodular callus; (b) CCR callus.*

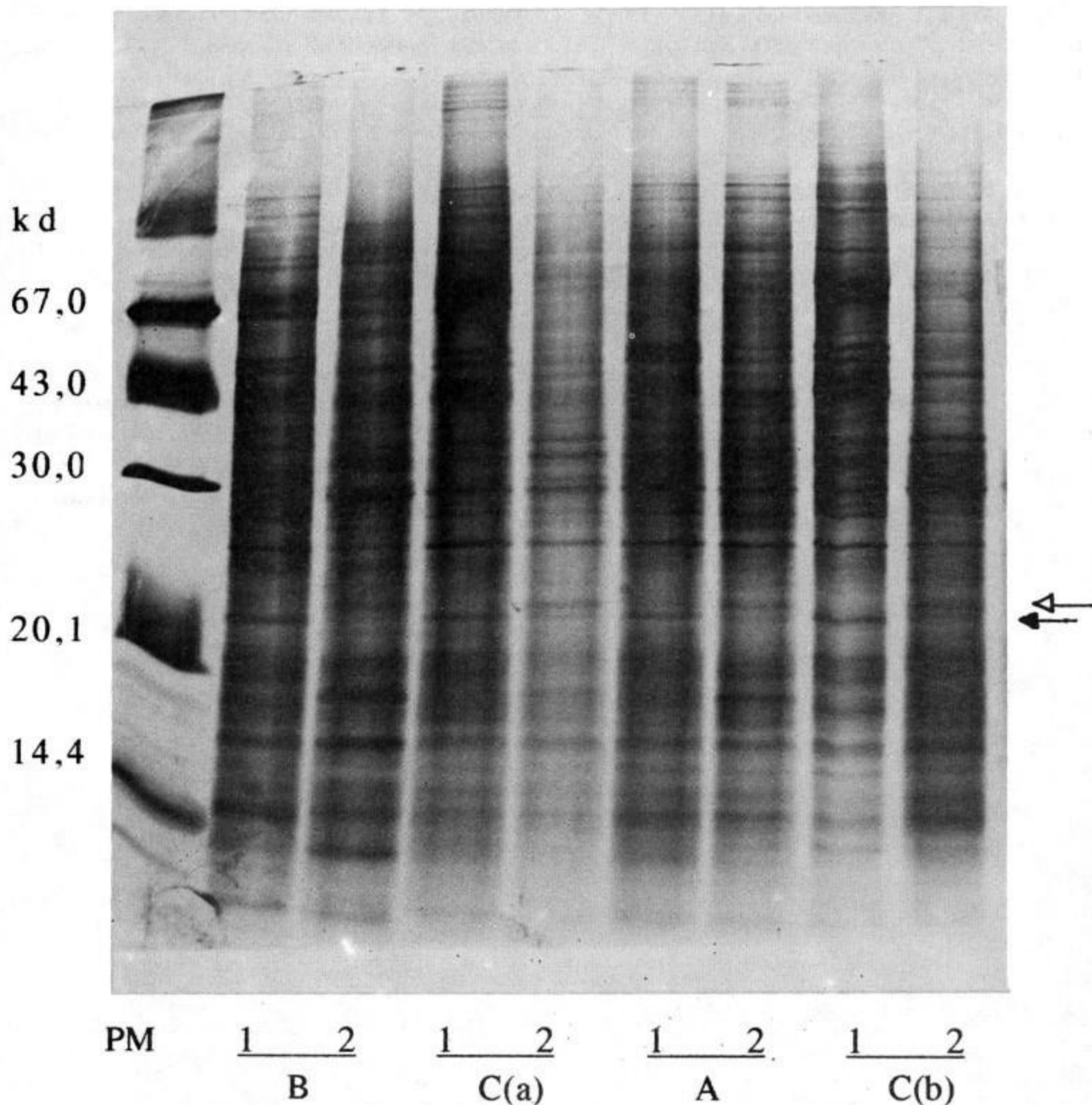


Fig. 3. — Profils protéiques sur gel de polyacrylamide. Comparaison des deux types de cals pour différents clones A, B et C avec une répétition de cals (a) et (b) pour le clone C. Mise en évidence d'une protéine spécifique (↔) et de la diminution en intensité d'une bande (←) chez les cals de type CCR. 1 = cal nodulaire; 2 = cal de type CCR; PM = marqueur de masse moléculaire.

Fig. 3. — Polyacrylamide gel of proteins. Comparison of the two types of calli for different clones A, B and C with a repetition of calli (a) and (b) for the clone C. Characterization of a specific protein (↔) and the diminution of intensity of a band (←) for the CCR calli. 1 = nodular callus; 2 = CCR callus; PM = molecular weight marker.

résultats de notre étude préliminaire avec l'étude des dosages hormonaux nous permettra de savoir si la présence de la protéine de 22,2 kd est liée à la perturbation hormonale, et donc à l'anomalie induite par culture *in vitro*.

Note remise le 4 mars 1991, acceptée après révision le 22 juillet 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. PANNETIER, P. ARTHUIS et D. LIEVOUX, *Oléagineux*, 36, n° 3, 1981, p. 119-122.
- [2] H. RABECHAUPT et J. P. MARTIN, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 283, série D, 1976, p. 1735-1737.
- [3] Y. DUVAL, T. DURAND GASSELIN, K. KONAN et C. PANNETIER, *Oléagineux*, 43, 1988, p. 39-47.

- [4] J. AHEE, P. ARTHUIS, G. CAS, Y. DUVAL, G. GUENIN, J. HANOWER, D. LIEVOUX, C. LIORET, B. MALAURIE, C. PANNETIER, D. RAILLOT, C. VARECHON et I. ZUCKERMAN, *Oléagineux*, 36, n° 3, 1981, p. 113-114.
- [5] J. SCHWENDIMAN, C. PANNETIER et N. MICHAUX-FERRIERE, *Annals of Botany*, 62, 1988, p. 43-52.
- [6] J. HANOWER et C. PANNETIER, *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture*, Tokyo, 1982, p. 745-746.
- [7] M. M. BRADFORD, *Analytical Biochemistry*, 72, 1976, p. 248-253.
- [8] U. K. LAEMMLI, *Nature*, 227, 1970, p. 680-685.
- [9] B. R. OAKLEY, D. R. KIRSH et N. R. MORRIS, *Analytical Biochemistry*, 105, 1980, p. 361-363.
- [10] I. BESSE, J. L. VERDEIL, Y. DUVAL, B. SOTTA, R. MALDINEY et E. MIGINIAC, *Proc. 14th Intl. Cong. Plant Growth Substances* (sous presse), Amsterdam, 1991.

---

P. M. : *L.R.G.A.P.T. (Laboratoire des Ressources génétiques et Amélioration des Plantes tropicales ORSTOM (Institut français de Recherche scientifique pour le Développement en Coopération), B.P. n° 5045, 34032 Montpellier Cedex 1;*

I. B. et J.-L. V. : *L.R.G.A.P.T., ORSTOM-I.R.H.O./C.I.R.A.D., B.P. n° 5045, 34032 Montpellier Cedex 1.*

---

## Variabilité enzymatique dans quelques populations naturelles de l'espèce *Helix aspersa* Müller

LUC MADEC

**Résumé** — La variabilité géographique en sept locus enzymatiques polymorphes a été étudiée dans quatorze populations de l'espèce *Helix aspersa*. S'il existe une relative stabilité des fréquences alléliques à l'échelle d'une localité, plusieurs types de facteurs, sélectifs ou fortuits, ont conduit à une différenciation importante entre populations géographiquement éloignées.

### Enzymatic variation in natural populations of *Helix aspersa* Müller

**Abstract** — Geographic variability of seven enzyme polymorphic loci was studied in fourteen populations of *Helix aspersa*. Although allelic frequencies were relatively stable at locality level, we found that several stochastic or selective factors were involved in a significant differentiation between geographically distant populations.

**Abridged English Version** — *Helix aspersa* is a Pulmonate mollusc that probably originates from the Western Mediterranean area. Man could have been involved in the extension of its range to Western Europe and in its recent occurrence in other continents, but these successful colonizations could also be explained as the result of a remarkable adaptability of the species.

In this study, we present some results on enzymatic polymorphism in fourteen natural populations to illustrate their genetic diversity at the level of the locality (Lorient, Rennes), the region (Brittany) and the distribution area. Samples, including about thirty individuals for each population except two of them, were examined by P.A.G.E. for nine enzymatic loci.

In Brittany, prevalent alleles are generally the same in the three sectors studied. Nevertheless, there is a change of majority allele from one locality to the other for two loci (MDH-1, PGM-2). Such phenomena have already been observed for *Cepaea nemoralis* ([5] à [8]) and *Helix aspersa* for which variability of MDH-1 on the West coast of the U.S.A. would be related to the existence of a climatic gradient (clines) or a consequence of historical events [9].

The variability within a locality is logically lower than the one observed between the three districts. One can easily regroup the colonies with the help of some electromorphs which are absent or rare in one group and very common in another (PGI-1<sup>110</sup>, SOD-1<sup>120</sup>, MDH-1<sup>110</sup>). The number of alleles detected at a locus can also permit these groups to be distinguished: at LAP-1, colonies from Lorient present at least five alleles whereas at most three of them are detected in populations from Rennes and Campbon. However, this qualitative variations leads only to a modest differentiation between localities because exclusive alleles are always weakly represented.

If we consider all the populations, we remark that differences between Southern France and Breton colonies are based on some uncommon allozymes at LAP-1 and EST-3: substitutions of "fast" electromorphs for "slow" ones seem to have induced the differentiation of the populations from Toulouse, St-Hubert and Perthus. Such results have already been observed for *Cepaea nemoralis* [10].

The genetic constitution of the population from La Réunion is closest to those from Lorient, the only notable difference being the possible loss of four alleles in this

Note présentée par Maurice FONTAINE.



sample. However, only thirty one animals from La Réunion have been analyzed so, if we take account of frequencies of these alleles in the populations from Lorient, one can assume that they exist in the population from La Réunion. Nevertheless, if the loss is real, it can be related to a founder effect. A historical hypothesis for the introduction in this island of snails native to Lorient is plausible and would implicate the India Company, which was based in Lorient and which used La Réunion as a stopping point on the route to India.

Allelic frequency patterns of populations from Algeria are very original and even, for the colony from Annaba, difficult to compare with the others for the following reasons: five alleles are exclusively found in this colony (MDH-1<sup>85,115</sup>, LAP-1<sup>80</sup>, PGI-1<sup>90</sup>, PGM-2<sup>85</sup>), EST-3 cannot be analyzed, GOT-1 is invariable and ten alleles are detected at LAP-1. The population from Alger is characterized by the monomorphism of MDH-1 (MDH-1<sup>90</sup>); this allele does not seem to exist in Annaba.

Results on genic diversity indicate at first that *Helix aspersa* seems to be a very polymorphic species but we have to recall that only nine loci have been analyzed.

At the level of the population, the low rate of heterozygosity observed in the colony from "Fort-Bloqué" (LTF) probably reflects the harsh ecological conditions of this locality (sparse vegetation, sandy soil), because the two other species studied (*Cepaea nemoralis*, *Theba pisana*) living on this site present the same particularity.

Finally, the diversity of isozyme polymorphism in *Helix aspersa* seems to be controlled by several kinds of factors. Historical and demographic events often related to the activity of man can explain differences between populations such as, in this study, the loss of some alleles in the colony from La Réunion. On the other hand, selective pressures of climatic or pedologic type suggest a relation between genetic variability and ecological heterogeneity; they could influence the geographic distribution of allozymes, demonstrating the adaptive nature of some of them.

---

*Helix aspersa* Müller est un Mollusque Pulmoné dont l'origine semble être le bassin méditerranéen occidental ([1], [2]). Cette aire de répartition initiale s'est ensuite élargie à la faveur de plusieurs vagues de migrations liées aux déplacements et à l'activité de l'homme. Ainsi, l'espèce a colonisé l'Europe de l'Ouest en se cantonnant dans un premier temps aux zones littorales puis, très récemment, s'est implantée sur d'autres continents. Cette vaste répartition géographique s'accompagne d'une variabilité intraspécifique considérable affectant aussi bien le cycle de vie des animaux que leur morphologie. Les études portant sur des populations installées dans des stations représentatives de l'hétérogénéité écologique du domaine de l'espèce indiquent en particulier une différenciation importante (morphologie de la coquille, génitalia distales) entre les colonies d'Europe ou originaires de ce continent et celles du Maghreb ([3], [4]). Nous présentons ici quelques résultats relatifs au polymorphisme enzymatique dans quatorze populations naturelles; ils sont destinés à illustrer la diversité de ce polymorphisme au sein d'une même localité (Lorient, Rennes), dans une région (Bretagne) et enfin, à l'échelle de l'aire de répartition.

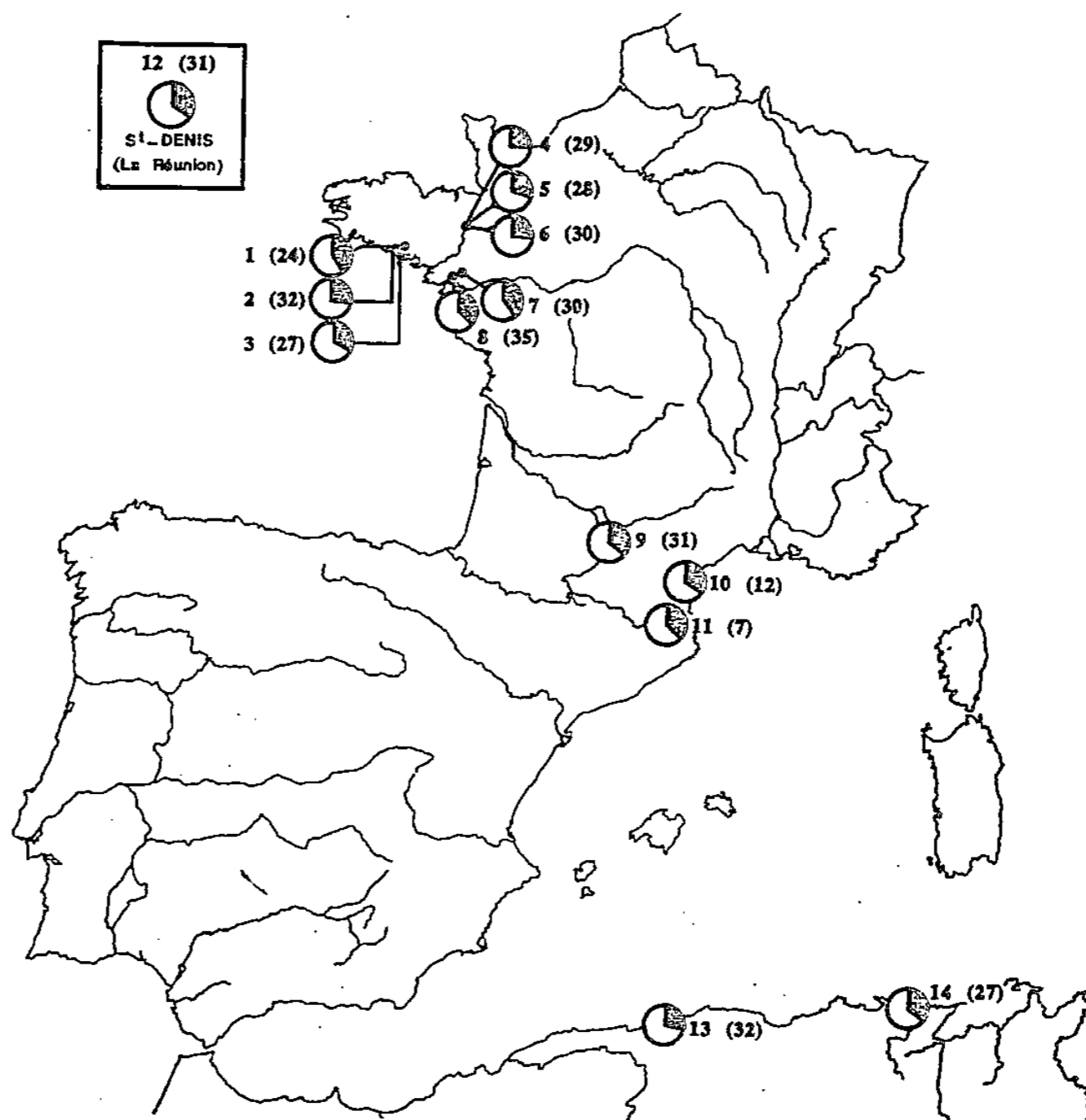
Les échantillons sont constitués d'individus adultes collectés sur des surfaces inférieures à celle de l'unité panmixte [4]. La technique d'électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide a permis l'analyse de neuf locus enzymatiques sur les quatorze systèmes éprouvés : un locus des estérases (Est-3), un locus de leucine-aminopeptidase (LAP-1), un locus de malate déshydrogénase (MDH-1), un locus de glutamate-oxaloacétate-transaminase (GOT-1), un locus de phosphoglucomutase (PGM-2), un locus de phosphogluco-isomérase (PGI-1), un locus de superoxyde-dismutase (SOD-1) et deux locus

monoalléliques, l'un codant pour l'enzyme malique (Me-1), l'autre pour la glycér phosphate-déshydrogénase (GPD-1). Les fréquences alléliques relatives aux sept locus polymorphes sont présentées dans le tableau I, les valeurs des hétérozygoties observées ( $h_o$ ) et théorique ( $h_c$ ) figurant quant à elles dans le tableau II.

A l'échelle de la Bretagne, les allèles prédominants sont généralement les mêmes dans chacun des trois secteurs étudiés. Pour deux locus (MDH-1, PGM-2), il y a toutefois un changement d'allèle majoritaire d'une localité à l'autre. Un tel phénomène a déjà été observé par plusieurs auteurs pour *Cepaea nemoralis* ([5] à [8]) et pour *Helix aspersa* [9]. Chez ce dernier, la variabilité de MDH-1 sur la côte ouest des États-Unis serait la conséquence soit de l'existence d'un gradient climatique (clines), soit d'événements d'ordre historique.

La variabilité intralocalité est bien plus faible que celle existant entre les populations de ces trois secteurs. On regroupe ainsi aisément les populations grâce à certains allèles dont la fréquence, de nulle ou très faible dans un groupe, devient très élevée dans un autre secteur (PGI-1<sup>110</sup>, SOD-1<sup>120</sup>, MDH-1<sup>110</sup>). Le nombre d'allèles détectés à un locus permet également de différencier ces groupes de populations; au locus LAP-1, les colonies du littoral oriental se distinguent par la présence d'au moins cinq allèles, alors qu'au plus trois d'entre eux sont décelés dans les populations de Rennes et Campbon. La position de l'échantillon de La Chapelle est intermédiaire en ce sens qu'il y existe une grande diversité allélique mais aussi une fréquence très élevée de l'allèle LAP-1<sup>100</sup>. Cette variation qualitative n'induit toutefois qu'une différenciation modeste entre les localités, les allèles exclusifs du secteur oriental étant toujours très faiblement représentés.

Les fréquences alléliques relatives aux locus Est-3 et GOT-1 ne traduisent aucune influence de la localisation géographique de ces populations bretonnes. Notons toutefois



Localisation géographique et représentation de l'hétérozygotie calculée moyenne des quatorze populations d'*Helix aspersa* étudiées. Entre parenthèses : taille de l'échantillon.

Collection localities and representation of mean genic diversity in fourteen populations of *Helix aspersa*. In parentheses: sample size.

TABLEAU I

Fréquences alléliques à sept locus enzymatiques dans quatorze populations d'*Helix aspersa*.*Allele frequencies at seven enzymatic loci in fourteen populations of Helix aspersa.*

Locus	Allèles	Bretagne								Sud-Ouest			Outre-Mer		
		Morbihan (Lorient)			Ille-et-Vilaine (Rennes)			Loire- Atlantique		Haute- Garonne	Aude	Pyrénées orientales	La Réunion	Algérie	
		LTL [1]	LFT [2]	LTT [3]	RSV [4]	RSC [5]	RSR [6]	CPB [7]	CHA [8]	TAS [9]	AUD [10]	PER [11]	LR [12]	AL <sub>1</sub> [13]	AL <sub>2</sub> [14]
SOD <sub>1</sub> . . . . .	75		0,037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	1,000	0,926	0,969	0,517	0,786	0,800	1,000	1,000	1,000	0,887	1,000	1,000	0,984	1,000
	120	-	0,037	0,031	0,483	0,214	0,200	-	-	0,113	-	-	-	0,016	-
GOT <sub>1</sub> . . . . .	80	0,083	0,019	-	-	-	0,250	0,183	0,171	-	-	-	-	0,063	-
	90	0,188	0,037	0,031	0,017	-	0,150	0,267	0,229	0,016	0,292	0,143	0,081	0,172	-
	100	0,667	0,944	0,969	0,983	0,929	0,600	0,283	0,600	0,936	0,708	0,857	0,919	0,766	1,000
	110	0,063	-	-	-	0,071	-	0,267	0,000	0,048	-	-	-	-	-
PGI <sub>1</sub> . . . . .	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,259
	100	0,938	0,981	0,875	1,000	1,000	1,000	0,717	0,800	1,000	1,000	0,714	1,000	1,000	0,741
	110	0,062	0,019	0,125	0,00	0,000	0,000	0,283	0,200	-	-	0,286	-	-	-
PGM <sub>2</sub> . . . . .	85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,074
	90	0,271	0,796	0,547	0,379	0,304	0,400	0,433	0,243	0,403	0,500	0,786	0,446	0,203	0,167
	100	0,646	0,204	0,453	0,569	0,696	0,600	0,567	0,757	0,597	0,500	0,214	0,514	0,707	0,759
	105	0,083	-	-	0,052	-	-	-	-	-	-	-	0,040	-	-
EST <sub>3</sub> . . . . .	95	0,146	-	0,016	-	0,089	0,050	0,000	0,086	0,097	-	0,214	0,162	-	-
	100	0,792	0,704	0,844	0,879	0,714	0,517	1,000	0,643	0,645	0,750	0,429	0,595	0,453	illisible
	105	0,063	0,296	0,141	0,121	0,196	0,250	0,000	0,100	0,258	0,250	0,286	0,243	0,547	-
	110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,071	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	0,183	-	0,171	-	-	0,071	0,297	-	-
MDH <sub>1</sub> . . . . .	85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,056
	90	0,188	0,130	0,266	0,017	0,125	0,083	0,500	0,286	0,113	0,125	0,071	0,365	1,000	-
	100	0,542	0,667	0,188	0,983	0,875	0,917	0,467	0,714	0,597	0,875	0,857	0,338	-	0,019
	110	0,271	0,204	0,547	-	-	-	0,033	-	0,290	-	0,071	0,297	-	0,463
	115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,463
LAP <sub>1</sub> . . . . .	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,056
	90	0,083	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,019
	92	0,292	0,056	0,313	-	0,125	0,033	0,133	0,014	-	-	-	0,081	0,047	0,315
	94	-	0,148	0,047	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,167
	96	0,104	0,037	0,016	0,328	0,125	0,050	0,200	0,071	0,323	0,250	0,429	-	0,547	0,037
	98	0,083	-	0,031	-	-	-	-	0,100	0,065	-	-	0,258	-	0,074
	100	0,417	0,741	0,578	0,672	0,750	0,917	0,667	0,786	0,500	0,500	0,143	0,661	0,266	0,111
	103	0,021	0,019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,047	0,185
	105	-	-	0,016	-	-	-	-	0,029	0,113	0,250	0,286	-	0,094	0,019
	110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,143	-	-	0,019

le monomorphisme étonnant de la colonie de Campbon au locus Est-3 ainsi que l'absence d'activité décelée à ce même locus dans les populations de La Chapelle et de Rennes-R.

Si l'on considère l'ensemble des populations, il existe entre les colonies bretonnes et celles du Sud-Ouest de la France des différences déterminées par quelques allèles minoritaires aux locus LAP-1 et Est-3. Des allozymes rapides semblent en effet se substituer à certaines allozymes lentes dans les colonies de Toulouse, Saint-Hubert et Perthuis. Un phénomène de même nature a été observé pour *Cepaea nemoralis* [10]; d'autres travaux mentionnent pour cette espèce l'existence de variations clinales des fréquences alléliques aux locus LAP-1, LAP-2, MDH-1, PGI-1 ([11], [12]).

TABLEAU II

Valeurs des hétérozygoties observées ( $h_o$ ), calculées ( $h_c$ ) et de leurs écarts ( $d$ ) dans treize des populations d'*Helix aspersa* étudiées.

Observed and calculated heterozygosities ( $h_o$ ,  $h_c$ ) and deviations ( $d$ ) in thirteen populations of *Helix aspersa*.

Locus		Populations												
		RSV	RSC	RSR	LTL	LTF	LTT	CPB	CHA	TAS	AUD	LR	AL <sub>1</sub>	AL <sub>2</sub>
GOT <sub>1</sub> . . . . .	$h_o$	0,034	0,107	0,550	0,625	0,111	0,063	0,800	0,600	0,100	0,417	0,161	0,438	0,000
	$h_c$	0,034	0,133	0,555	0,510	0,071	0,060	0,744	0,558	0,088	0,413	0,145	0,380	0,000
	$d$	0,000	-0,195	-0,009	+0,225	+0,563	+0,042	+0,075	+0,075	+0,136	+0,001	+0,110	+0,153	0,000
EST <sub>3</sub> . . . . .	$h_o$	0,172	0,500	allèle	0,333	0,296	0,156	0,000	allèle	0,375	0,333	0,423	0,375	
	$h_c$	0,212	0,443	nul	0,348	0,417	0,268	0,000	nul	0,505	0,375	0,557	0,436	-
	$d$	-0,187	+0,129		-0,043	-0,290	-0,416	0,000		-0,258	-0,112	-0,240	-0,244	
LAP <sub>1</sub> . . . . .	$h_o$	0,331	0,428	0,150	0,625	0,370	0,594	0,400	0,314	0,590	0,583	0,550	0,438	0,667
	$h_c$	0,441	0,406	0,141	0,716	0,425	0,564	0,498	0,367	0,631	0,625	0,492	0,617	0,806
	$d$	-0,295	+0,054	+0,064	-0,127	-0,129	+0,053	-0,197	-0,144	-0,065	-0,067	+0,118	-0,291	-0,172
PGM <sub>2</sub> . . . . .	$h_o$	0,793	0,536	0,333	0,542	0,333	0,531	0,666	0,429	0,500	0,500	0,538	0,282	0,481
	$h_c$	0,530	0,423	0,480	0,503	0,324	0,496	0,491	0,368	0,480	0,500	0,534	0,324	0,390
	$d$	+0,496	+0,267	-0,306	+0,077	+0,029	+0,071	+0,356	+0,164	+0,042	0,000	+0,007	-0,130	+0,233
PGI <sub>1</sub> . . . . .	$h_o$	0,000	0,000	0,000	0,125	0,037	0,187	0,566	0,400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	$h_c$	0,000	0,000	0,000	0,117	0,037	0,219	0,406	0,320	0,000	0,000	0,000	0,000	0,384
	$d$	0,000	0,000	0,000	+0,068	0,000	-0,146	+0,394	+0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,036
MDH <sub>1</sub> . . . . .	$h_o$	0,034	0,250	0,150	0,542	0,519	0,594	0,533	0,514	0,548	0,250	0,770	0,000	0,333
	$h_c$	0,034	0,219	0,139	0,598	0,497	0,595	0,531	0,408	0,549	0,219	0,665	0,000	0,568
	$d$	0,000	+0,041	+0,079	-0,094	+0,143	-0,001	+0,004	+0,260	-0,001	+0,141	+0,158	0,000	-0,413
SOD <sub>1</sub> . . . . .	$h_o$	0,621	0,428	0,400	0,000	0,148	0,063	0,000	0,000	0,097	0,000	0,000	0,031	0,000
	$h_c$	0,499	0,406	0,320	0,000	0,140	0,060	0,000	0,000	0,201	0,000	0,000	0,031	0,000
	$d$	+0,244	+0,054	+0,250	0,000	+0,057	+0,042	0,000	0,000	-0,502	0,000	0,000	0,000	0,000
	$\bar{H}_o$	0,281	0,321	0,263	0,399	0,259	0,312	0,424	0,392	0,316	0,298	0,349	0,233	0,309
	$\bar{H}_c$	0,250	0,280	0,261	0,399	0,273	0,323	0,381	0,363	0,327	0,305	0,342	0,264	0,358
	$\bar{d}$	+0,123	+0,147	+0,011	0,000	-0,051	-0,034	+0,110	+0,078	-0,035	-0,023	+0,020	-0,116	-0,138

La population de La Réunion présente des caractéristiques génétiques très proches de celles des colonies de la région lorientaise puisque la seule différence notable est l'absence de quatre allèles dans l'échantillon de La Réunion (PGI-1<sup>110</sup>, SOD-1<sup>120</sup>, LAP-1<sup>96</sup>, LAP-1<sup>103</sup>), perte d'autant plus relative que ces allèles sont très rares dans les colonies lorientaises et que l'échantillon de La Réunion n'est composé que de trente et un individus. Cette remarquable similarité conforte l'hypothèse d'une introduction au XVII<sup>e</sup> siècle à La Réunion (lieu de ravitaillement sur la route des Indes) de petits-gris originaires de Lorient (port de la compagnie des Indes).

La constitution génétique des populations d'Algérie semble tout à fait originale et même, pour la colonie d'Annaba, difficilement comparable à celle des autres populations. Outre l'impossibilité d'analyser le locus Est-3, on remarque en effet que cinq allèles appartenant à quatre locus y sont exclusivement décelés (MDH-1<sup>85, 115</sup>, LAP-1<sup>80</sup>, PGI-1<sup>90</sup>, PGM-2<sup>85</sup>), que le locus GOT-1 est monomorphe, qu'au contraire le locus LAP-1 est particulièrement polymorphe puisque les dix allèles sont représentés. La population d'Alger se caractérise quant à elle par un allèle unique au locus MDH-1, en l'occurrence MDH-1<sup>90</sup> qui ne semble pas exister à Annaba.

Les valeurs de l'hétérozygotie calculée moyenne indiquent tout d'abord qu'*Helix aspersa* semble une espèce très polymorphe, même si ce paramètre n'est pas, dans nos conditions d'étude, une mesure rigoureuse du degré de polymorphisme (*fig.*). Quelques différences entre populations peuvent ensuite être dégagées. La population du Fort-Bloqué (LTF)

se distingue ainsi des deux autres colonies de Lorient par son hétérozygotie plus faible. Dans cette station (LTF), ce phénomène affecte non seulement *Helix aspersa* mais aussi *Cepaea nemoralis* et *Theba pisana*, ce qui suggère une influence de l'environnement (substrat sableux de l'arrière-dune littorale). A cet égard, Nevo et Bar (1976) observent qu'en Israël les populations de *Theba pisana* vivant sur sol sableux présentent elles aussi un taux d'hétérozygotie particulièrement faible.

On peut également supposer que les conditions écologiques particulières subies par la population d'Alger sont en partie responsables de sa faible diversité génique moyenne mais, compte tenu du polymorphisme considérable de l'échantillon d'Annaba, cette hypothèse souffre actuellement du nombre insuffisant de colonies algériennes étudiées et de notre méconnaissance de la répartition sur ce territoire des deux formes rencontrées (*H. a. aspersa*; *H. a. maxima*).

Les taux d'hétérozygotie peu élevés caractérisant les colonies de Rennes pourraient être quant à eux l'une des conséquences de l'introduction initiale de quelques animaux (fondateurs) dans des jardins isolés.

Cette étude préliminaire suggère que la diversité du polymorphisme enzymatique peut être due chez *Helix aspersa* à l'influence de plusieurs types de facteurs. Les uns, d'ordre historique, permettent parfois de comprendre des différences entre colonies (Lorient, La Réunion) liées à la perte de certains allèles (effets de fondation). *Helix aspersa* est une espèce particulièrement anthropophile dont l'implantation et la survie dans de nouveaux territoires dépendent beaucoup des activités de l'homme. D'autres facteurs suggèrent l'idée d'une relation entre variabilité génétique et hétérogénéité écologique, par ailleurs abondamment illustrée par certains auteurs [14]. Des pressions sélectives de type climatique, traduites par des variations clinales, ou pédologique, illustrées par des variations parallèles des taux d'hétérozygotie au sein de colonies mixtes (LTF), semblent intervenir dans la distribution géographique des allozymes, démontrant ainsi la nature adaptative de certaines d'entre elles.

Note remise le 8 avril 1991, acceptée après révision le 14 août 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. SACCHI, *Vie et Milieu*, 9, (1), 1958, p. 11-52.
- [2] J. PEAKE, dans *Pulmonates*, Academic Press, London, 2A, 1978, p. 429-526.
- [3] H. CHEVALLIER, *Bull. Mus. natn. Hist. nat.*, 448, 3<sup>e</sup> série, 1977, p. 425-442.
- [4] L. MADEC, *Doct. Univ.*, Rennes-I, 345, 1989, 380 p.
- [5] M. S. JOHNSON, *Heredity*, 36, 1976, p. 105-121.
- [6] J. S. JONES, R. K. SELANDER et G. SCHNELL, *Biol. J. Linn. Soc.*, 14, 1980, p. 359-387.
- [7] M. VALDEZ-FORSANS, *Publ. Lab. Zool. E.N.S.*, 29, 1986, 181 p.
- [8] I. KASSEM, *Publ. Lab. Zool. E.N.S.*, 33, 1987, 191 p.
- [9] R. K. SELANDER et M. OCHMAN, dans *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, A. R. LISS éd., New York, 10, 1983, p. 93-123.
- [10] A. GUILLER, *D.E.A. Agronomie*, Rennes, 1988, 111 p.
- [11] M. OCHMAN, J. S. JONES et R. K. SELANDER, *Heredity*, 58, (1), 1987, p. 127-139.
- [12] M. VALDEZ, I. KASSEM et M. LAMOTTE, *Génét. Sél. Évol.*, 20, (4), 1988, p. 441-460.
- [13] E. NEVO et Z. BAR, dans *Population Genetics and Ecology*, Academic Press, New York, 1976, p. 159-184.
- [14] E. NEVO, *Theor. Pop. Biol.*, 13, 1978, p. 121-177.

Université de Rennes-I, Laboratoire de Zoologie générale et Écophysiologie,  
avenue du Général-Leclerc, 35042 Rennes.

## Expression of a gene encoding a novel potential IGF binding protein in human tissues

Cécile MARTINERIE and Bernard PERBAL

**Abstract** — We have shown in a previous study that the expression of an as yet unidentified, embryonic gene (*nov*) encoding a potential IGF binding protein was upregulated in all of eight virally-induced avian nephroblastomas tested. We now report that homologous sequences are conserved in human DNA and are expressed in normal human bone marrow, thymic cells and in one nephroblastoma.

### Expression dans les tissus humains d'un gène codant pour un nouveau type de protéine liant les IGF

**Résumé** — Nous avons établi précédemment que dans les néphroblastomes aviaires induits par MAV1, un gène embryonnaire nouveau (*nov*) codant pour une protéine liant potentiellement les IGF est surexprimé. Nous montrons dans cette communication que des séquences homologues de *nov* existent chez l'homme et sont transcrites sous forme d'ARN de tailles différentes dans les cellules provenant d'un néphroblastome, de la moelle osseuse, et du thymus.

**Version française abrégée** — Il est admis depuis de nombreuses années que le néphroblastome induit par le virus auxiliaire de la myéloblastose aviaire (MAV) constitue un modèle animal de la tumeur de Wilms chez l'enfant ([1], [2]). Bien que ces deux types de tumeurs aient des étiologies différentes (aucun virus n'a été associé jusqu'à présent au développement du néphroblastome humain), nous pensons que l'étude, au niveau moléculaire des néphroblastomes viro-induits, puisse permettre de caractériser des paramètres difficilement accessibles dans le système humain. Il existe un assez grand nombre d'évidences expérimentales suggérant que des mutations récessives soient impliquées dans le développement de la tumeur de Wilms. Les loci génétiques correspondants qui ont été identifiés sont localisés en 11p13 et 11p15 et un troisième locus non identifié est situé dans une région chromosomique extérieure à 11p ([3]-[10]). Plus récemment, il a été montré que l'un des gènes candidats, situé dans la région 11p13 qui est altérée dans le syndrome de WAGR (Wilms, aniridie, dysplasie urogénitale, retard mental), code pour une protéine à doigts de zinc qui pourrait être un facteur régulateur de transcription ([11], [12]). L'extinction de l'expression du gène *Wit2* est associée essentiellement aux tumeurs hétérogènes, [13] et très peu aux tumeurs homogènes, ce qui suggère que plusieurs gènes différents soient impliqués dans la genèse du néphroblastome humain.

Nous avons montré que la souche de MAV1 que nous avons isolée à partir d'un génome proviral cloné [14] induit spécifiquement des néphroblastomes chez la Poule [15] et constitue donc un système expérimental de choix pour étudier les mécanismes moléculaires de l'induction des néphroblastomes.

Une étude récente nous a permis d'établir que des réarrangements de plus en plus importants du génome proviral de MAV étaient associés à la progression tumorale. De plus, nous n'avons pas pu mettre en évidence de site d'intégration proviral commun dans 22 tumeurs indépendantes représentant différents stades de développement (Joliot et coll. soumis pour publication). Nous avons cependant montré que huit tumeurs sur huit analysées, expriment, à des niveaux variables, un gène embryonnaire nouveau (*nov*) qui est éteint dans les cellules

Note présentée par Raymond LATARJET.

de rein adulte normal et qui code pour une protéine potentielle de 32 kDa contenant un motif consensus des protéines se liant aux facteurs de croissance de la famille des IGF (Joliot et coll., soumis pour publication).

Il était donc intéressant de rechercher si ce gène avait été conservé au cours de l'évolution et si il était exprimé chez l'Homme. Des expériences d'hybridation réalisées dans des conditions stringentes nous ont permis de montrer que des séquences homologues de *nov* existent dans le génome humain (*fig. 1 B*). Nous avons isolé à partir d'une banque d'ADN de placenta humain deux groupes de clones  $\lambda$  recombinants ( $\lambda$  Hu92 et  $\lambda$  Hu93) qui contenaient les séquences homologues de *nov* dans deux fragments PstI respectivement de 600 et 700 paires de bases (PBP06 et PSP07) (*fig. 1 A*).

Les fragments d'ADN PBP06 et PSP07 ont été purifiés et utilisés comme sondes moléculaires pour rechercher l'expression éventuelle d'ARN apparentés à *nov* dans les cellules de la moelle osseuse, du thymus et de deux néphroblastomes humains. Les résultats obtenus (*fig. 1 C*) montrent que le gène humain homologue du gène *nov* de Poule est exprimé sous la forme d'au moins un ARN de 2,7 kb dans les cellules de la moelle osseuse normale et d'un néphroblastome, et d'un ARN de 7,4 kb dans les cellules du thymus (détecté seulement par la sonde PSP07). Ces résultats indiquent que l'expression du gène *nov* chez l'Homme est régulée de manière tissu spécifique.

La séquence nucléotidique des deux fragments d'ADN PBP06 et PSP07 a été déterminée. Nous avons ainsi établi que ces deux fragments présentaient une homologie supérieure à 70 % avec les exons 2, 3 et 4 du gène *nov* de Poule. La comparaison des séquences en acides aminés de ces deux fragments avec celle du gène *nov* de Poule, a révélé de plus, la conservation d'un grand nombre de résidus entre les deux espèces (53/77, 59/77 et 19/22 pour, respectivement, les exons 2, 3 et 4) (*fig. 2*).

Il est intéressant de remarquer que la séquence consensus des protéines liant les IGF, présente dans l'exon 2 du gène *nov* de Poule est conservée dans le gène humain. La séquence partielle en acides aminés du gène *nov* humain n'est identique à aucune des séquences protéiques contenues dans la banque de données Genpro data bank. Il semble donc que le gène *nov* humain appartienne à une nouvelle famille de protéines liant les IGF.

Il sera intéressant de déterminer si les séquences identifiées sont également surexprimées dans les tumeurs de Wilms. Cette étude ne sera permise que lorsque nous aurons obtenu des renseignements plus précis sur l'organisation génomique du locus humain en question et cloné au moins un ADNc contenant plusieurs exons de ce locus. Une telle approche nécessitera également l'analyse des différents types de néphroblastomes humains (homogènes et hétérogènes) qui ont été décrits jusqu'à présent et dans lesquels les altérations d'expression géniques ne sont pas toujours identiques.

Enfin, il a été montré que le gène codant pour l'IGF II est localisé en 11p15 ([18], [19]) et est surexprimé dans certaines tumeurs de Wilms. Il est tentant de penser que le gène « *nov* » humain, qui possède également le motif consensus des protéines se liant à l'IGF, puisse jouer un rôle important dans le développement des néphroblastomes en conjonction avec la dérégulation de l'expression d'IGFII.

---

INTRODUCTION. — The avian nephroblastoma induced by Myeloblastosis Associated Virus (MAV) is generally considered to represent a good model of the human Wilms tumor because of the histological similarities (embryonic tissues consisting of a heteroge-

neous mixture of immature and differentiating renal elements) existing between the two tumors ([1], [2]).

There is a growing body of evidence suggesting that recessive alleles at genetic loci assigned to chromosome 11p13, 11p15 and outside of 11p are involved in the tumorigenesis ([3]-[10]). Recently, one of the candidate Wilms tumor genes, located at the chromosome 11p13 locus within the WAGR (Wilms tumor, aniridia, genitourinary dysplasia, mental retardation) complex, was reported to encode a potential zinc finger protein ([11], [12]). An absence of or a reduction in the expression of *Wit2* has been reported in heterogeneous Wilms tumors associated with the WAGR syndrome, while only a few homogeneous Wilms tumors associated with the Beckwith-Wiedemann syndrome showed reduced expression of this gene [13]. This observation indicates that the molecular basis of this pathology is complex and must involve more than one gene.

We had previously shown that the genetically pure MAV1 strain derived from an infectious proviral clone [14], specifically induced nephroblastoma when injected in day-old chicken [15] and therefore represented a unique tool to undertake the study of the molecular events involved in the genesis of MAV-induced nephroblastoma. In a recent study, we could establish that increasing levels of proviral rearrangements were associated with tumor progression and that 22 independent avian tumors, representative of different developmental stages, contained no common MAV1 integration site (Joliot *et al.*, submitted for publication). Furthermore, we could show that all of eight nephroblastomas tested expressed high levels of an as yet unidentified, cellular gene (*nov*) whose expression is normally extinguished in adult kidney cells (Joliot *et al.*, submitted for publication). These observations prompted us to examine whether a similar situation could possibly be encountered in human tumor cells. As a first step in our investigation, we searched for the existence and expression of a human equivalent to the chicken *nov* gene. The results presented in this communication indicate that human sequences homologous to *nov* correspond to a new gene which is expressed in normal hematopoietic cells and in one nephroblastoma.

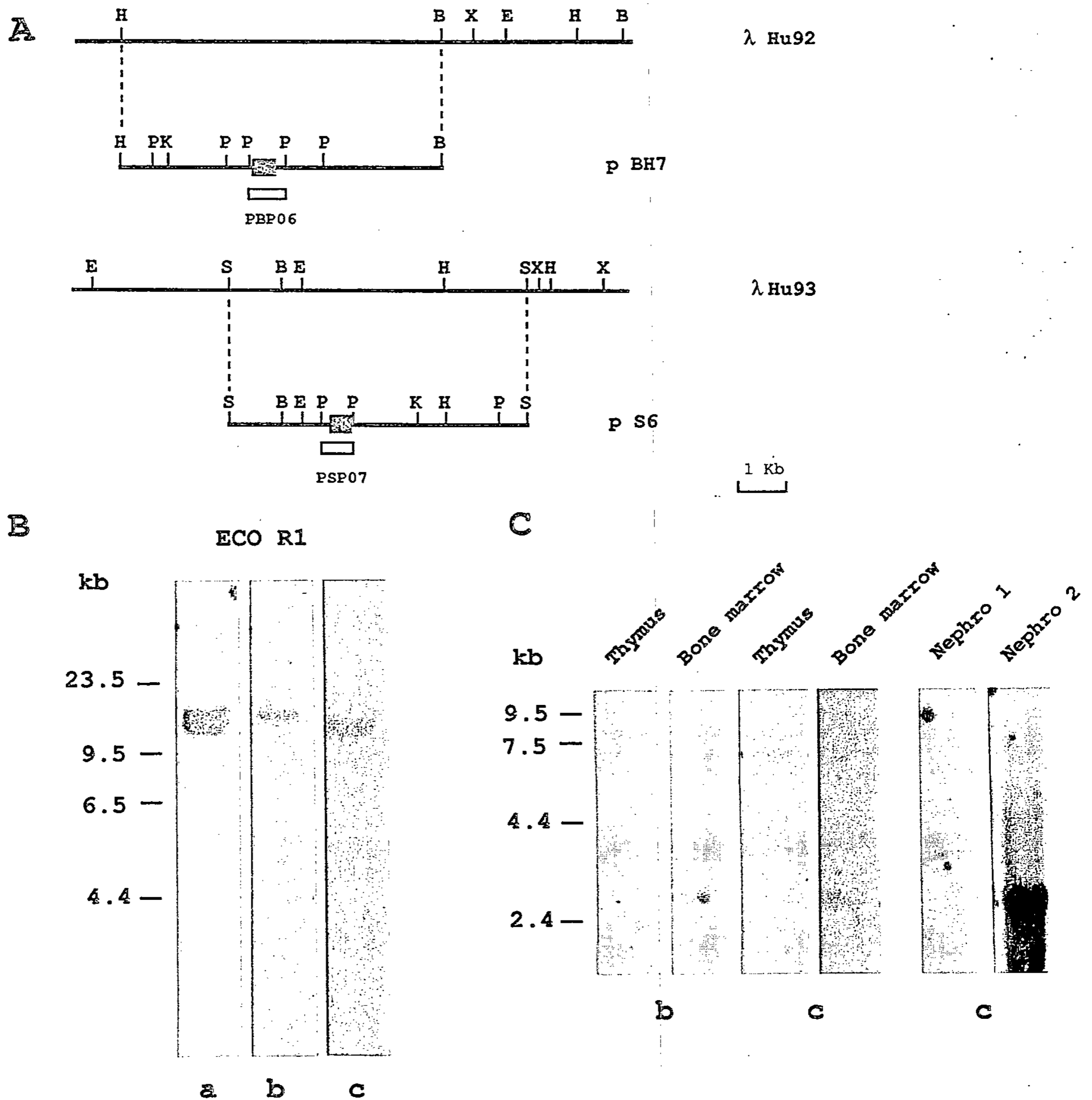
**MATERIALS AND METHODS.** — *Molecular Cloning Procedures.* — Dichloromethane was used for nucleic acid purification, as previously described [16]. Southern and Northern blotting and all other cloning procedures were performed according to standard published protocols [17]. DNA fragments were purified according to the GeneClean method (Bio101). Radioactive probes were prepared by nick translation in the presence of  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP.

*Nucleotide sequencing.* — Sequencing was performed by the dideoxy chain termination method in the presence of  $\alpha$ -<sup>35</sup>S dATP and Sequenase (USB), under the conditions recommended by the supplier. Sequence data treatments were performed using the CITI2 facilities in Paris.

**RESULTS AND DISCUSSION.** — In order to determine whether *nov*-related sequences existed and were expressed in human cells, we first performed Southern blotting of EcoRI-digested DNA under stringent conditions [17] with the chicken *nov* cDNA clone (pC1K) which had been previously characterized in our laboratory (Joliot *et al.* submitted for publication). Four EcoRI fragments (15, 12, 8.0 and 5.6 kb) were visualized following hybridization of normal human digested DNA (*Fig. 1B*), indicating that the *nov* sequences were likely to be conserved in evolutionary distant species.

Screening of a normal human placental genomic library with the radiolabeled C1K probe allowed us to isolate two groups of  $\lambda$ -recombinant clones which gave a strong positive hybridization signal. The restriction maps of two such clones were established and we could determine, by successive rounds of hybridization, that the human sequences homologous to the chicken *nov* gene were localized in a 7.0 kb BamHI-Hind III DNA fragment of clone  $\lambda$  Hu 92 and in a 6.6 kb SacI DNA fragment of clone  $\lambda$  Hu 93





(Fig. 1 A). Subcloning of these fragments into the pUC18 and pUC19 vectors (clone pBH7 and pS6 respectively) permitted us to map more precisely the human nov sequences in two PstI DNA fragments of 600 and 700 base-pairs (Fig. 1 A).

When the purified PstI DNA fragments (PBP06 and PSP07) were used as probes in Southern hybridization experiments, only the 15 kb EcoRI DNA fragment was detected with PBP06 whereas the 12 kb EcoRI fragment only was detected with probe PSP07 (Fig. 1 B). This observation indicated that the human nov sequences contained in the PstI fragments corresponded to a subset of the nov exons represented in the chicken nov cDNA. The precise determination of the nov exon boundaries in the PstI DNA fragment must await the isolation of a human nov cDNA.

## FIGURE CAPTION I

Fig. 1. — A. Partial restriction maps of the Hu92 and the Hu93  $\lambda$  recombinant clones (top) and of the plasmidic subclones pBH7 and pS6 (bottom). The black boxes stand for human sequences homologous to the chicken nov gene. H=HindIII; B=BamHI; X=XhoI; E=EcoRI; P=PstI; S=SacI. B. Southern blot analysis of normal EcoRI digested DNA from human thymus (15  $\mu$ g) hybridized with the radiolabeled chicken probe C1K (lane a) and with the two human probes PBP06 (lane b) and PSP07 (lane c). Sizes are indicated in kilobases. C. Nov-specific mRNA species expressed in human normal bone marrow thymus and nephroblastoma. Following electrophoresis of RNA species (10  $\mu$ g) in agarose-formaldehyde gels and transfer on nitrocellulose, hybridization was performed with radiolabeled PBP06 (lane b) and PSP07 (lane c) probes. The BRL RNA ladder was used as molecular weight markers.

Fig. 1. — A. Cartes de restriction, partielles des clones  $\lambda$  recombinants humains Hu92 et Hu93 (haut), et des sous-clones plasmidiques pBH7 et pS6 (bas). Les fragments PBP06 et PSP07 ont été utilisés comme sondes dans les expériences d'hybridation. Les séquences humaines homologues du gène nov de Poule sont représentées par les carrés noirs. H=HindIII; B=BamHI; X=XhoI; E=EcoRI; P=PstI; S=SacI. B. Hybridation de l'ADN humain de thymus normal (15  $\mu$ g) digéré par EcoRI avec la sonde de Poulet C1K (piste a), et les sondes humaines PBP06 (piste b) et PSP07 (piste c). Les tailles sont indiquées en kilobases. C. Expression des ARNm spécifiques de nov, dans les cellules normales de la moelle osseuse, de thymus, et dans deux néphroblastomes. Après électrophorèse des ARN totaux (10  $\mu$ g) dans un gel d'agarose-formaldéhyde et transfert sur membrane de nitrocellulose, les hybridations ont été réalisées avec les sondes PBP06 (piste b) et PSP07 (piste c). Le mélange d'ARN commercialisé par BRL a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

Northern hybridization experiments performed with total RNA species purified from normal human bone marrow and thymic cells allowed us to demonstrate that the human nov gene is expressed in the form of a 2.7 kb mRNA species (detected by both PBP06 and PSP07 probes) in bone marrow cells and in the form of a 7.4 kb species (detected by probe PSP07 only) in thymic cells (Fig. 1 C). This observation indicated that the expression of nov is submitted to a tissue-specific type of regulation, and that slightly different nov products might be expressed in normal cells. The results obtained along a survey of several normal and tumoral tissues that we have performed in collaboration with Dr. Barrois and Pr. Riou, were in accordance with this conclusion (C. Martinerie *et al.*, manuscript in preparation). Interestingly, one of the two Wilms tumors which were analyzed in this group of samples turned out to express high levels of the 2.7 kb nov mRNA species (Fig. 1 C). The lack of detection of nov expression in the other tumor is probably the result of a difference in the differentiation state of the two tumors.

Nucleotidic sequencing of the PBP06 and PSP07 DNA fragments allowed us to demonstrate that the former contains a stretch of 249 nucleotides sharing 73% homology with exon 2 whereas the latter contained two stretches of 201 and 66 nucleotides sharing 74% homology with exons 3 and 4 of the chicken nov gene (data not shown). Alignments of predicted amino acid sequences from both origins revealed a significant amount of conserved residues in the human putative protein (53/77, 59/77 and 19/22 for exons 2, 3 and 4 respectively) (Fig. 2). The human sequences homologous to exon 2 contain a consensus for IGF binding proteins ([20]-[22]), as already reported for the chicken nov gene. Comparison of the amino acid sequences with the Genpro data bank indicated that the putative IGF binding protein encoded by the human nov gene is different from the other IGF binding proteins described so far ([20]-[28]). It therefore appears that it represents a novel kind of IGF binding protein.

Interestingly, the IGF II gene which has been assigned to human chromosome 11p15, has also been found to be overexpressed in some Wilms tumors and was therefore proposed to be potentially involved in this pathology ([18], [19]). Since the potential human nov product contains a consensus of IGF-binding proteins ([20]-[22]), it is tempting to speculate that the abnormal expression of nov protein might be related to the development of nephroblastoma in human. Our preliminary observations indicate that the 2.7 kb nov mRNA species are expressed in one out of two Wilms tumors tested thus

far. However, since it has been established that the Wilms tumors do not constitute a homogeneous family of cancer, at neither the cytological level nor at the molecular level, it will be crucial to analyze several sets of independent tumors before drawing any conclusion as to the possible association or implication of *nov* expression in the genesis of human nephroblastoma.

This work was supported by grants from ARC, Fondation pour la Recherche médicale, Ligue nationale contre le Cancer and I.N.S.E.R.M. (contrat n° 900110). Tumoral samples were analyzed in the course of a collaborative study performed with Dr. Barrois and Pr. Riou (C. Martinerie *et al.* manuscript in preparation).

Note remise le 21 janvier 1991, acceptée après révision le 12 août 1991.

#### REFERENCES

- [1] U. HEINE, G. DE THÉ, H. ISHIGURO, J. R. SOMMER, D. BEARD and J. W. BEARD, *J. Natl. Cancer Inst.*, 29, 1962, pp. 41-61.
- [2] H. ISHIGURO, D. BEARD, J. R. SOMMER, U. HEINE, G. DE THÉ and J. W. BEARD, *J. Natl. Cancer Inst.*, 29, 1962, pp. 1-38.
- [3] A. KOUFOS, M. F. HANSEN, B. C. LAMPKIN, M. L. WORKMAN, N. G. COPELAND, N. A. JENKINS and W. K. CAVENEE, *Nature*, 309, 1984, pp. 170-172.
- [4] S. H. ORKIN, D. S. GOLDMAN and S. E. SALLAN, *Nature*, 309, 1984, pp. 172-174.
- [5] A. E. REEVE, P. J. HOUSIAUX, R. J. M. GARDNER, W. E. CHEWINGS, R. M. GRINDLEY and L. J. MILLOW, *Nature*, 309, 1984, pp. 174-176.
- [6] E. R. FEARON, B. VOGELSTEIN and A. P. FEINBERG, *Nature*, 309, 1984, pp. 176-178.
- [7] A. KOUFOS, P. GRUNDY, K. MORGAN, K. A. ALECK, T. HADRO, B. C. LAMPKIN, A. KALBAKJI and W. K. CAVENEE, *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 1989, pp. 711-719.
- [8] A. J. PING, A. E. REEVE, D. J. LAW, M. R. YOUNG, M. BOEHNKE and A. P. FEINBERG, *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 1989, pp. 720-723.
- [9] P. GRUNDY, A. KOUFOS, K. MORGAN, F. P. LI, A. T. MEADOWS and W. K. CAVENEE, *Nature*, 336, 1988, pp. 374-376.
- [10] V. HUFF, D. A. COMPTON, L.-Y. CHAO, L. C. STRONG, C. F. GEISER and G. F. SAUNDERS, *Nature*, 336, 1988, pp. 377-378.
- [11] K. M. CALL, T. GLASER, C. Y. ITO, A. J. BUCKLER, J. PELLETIER, D. A. HABER, E. A. ROSE, A. KRAL, H. YEGER, W. H. LEWIS, C. JONES and D. E. HOUSMAN, *Cell*, 60, 1990, pp. 509-520.
- [12] M. GESSLER, A. POUSTKA, W. CAVENEE, R. L. NEVE, S. H. ORKIN and G. A. P. BRUNS, *Nature*, 343, 1990, pp. 774-778.
- [13] A. SUANG, C. E. CAMPBELL, L. BONETTA, M. S. MCANDREWS-HILL, S. CHILTON-MACNEILL, M. J. COPPES, D. J. LAW, A. P. FEINBERG, H. YEGER and B. WILLIAMS, *Science*, 250, 1990, pp. 991-994.
- [14] B. PERBAL, J. S. LIPSICK, J. SVOBODA, R. F. SILVA and M. A. BALUDA, *J. Virol.*, 56, 1985, pp. 240-244.
- [15] J. SORET, G. DAMBRINE and B. PERBAL, *J. Virol.*, 63, 1989, pp. 1803-1807.
- [16] V. MALOISEL and B. PERBAL, *Met. Mol. Cell. Biol.*, 1, 1990, pp. 245-247.
- [17] B. PERBAL, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, Second Edition, John Wiley and Sons, New York, 1988.
- [18] A. E. REEVE, M. R. ECCLES, R. J. WILKINS, G. I. BELL and L. J. MILLOW, *Nature*, 317, 1985, pp. 258-260.
- [19] J. SCOTT, J. COWELL, M. E. ROBERTSON, L. M. PRIESTLEY, R. WADEY, B. HOPKINS, J. PRITCHARD, G. I. BELL, L. B. RALL, C. F. GRAHAM and T. J. KNOTT, *Nature*, 317, pp. 260-262.
- [20] A. BRINKMAN, C. GROFFEN, D. J. KORTLEVE, A. GEURTS, A. G. VAN KESSEL and S. L. S. DROP, *E.M.B.O.J.*, 7, 1988, pp. 2417-2423.
- [21] C. BINKERT, J. LANDWEHR, J.-L. MARY, J. SCHWANDER and G. HEINRICH, *E.M.B.O.J.*, 8, 1989, pp. 2497-2502.
- [22] A. L. ALBISTON and A. C. HERINGTON, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 166, 1990, pp. 892-897.
- [23] W. I. WOOD, G. CACHIANES, W. J. HENZEL, G. A. WINSLOW, S. A. SPENCER, R. HELLMISS, J. L. MARTIN and R. C. BAXTER, *Mol. Endocrinology*, 2, 1988, pp. 1176-1185.
- [24] J. ZAPF, M. KIEFER, J. MERRYWEATHER, F. MASIARZ, D. BAUER, W. BORN, J. A. FISCHER and E. R. FROESCH, *J. Biol. Chem.*, 265, 1990, pp. 14892-14898.
- [25] M. KIEFER, F. MARIARZ, D. BAUER and J. ZAPF, *J. Biol. Chem.*, 266, 1991, pp. 9043-9049.
- [26] Y. L. LEE, R. L. HINTZ, P. M. JAMES, P. D. K. LEE, J. E. SHIVLEY and D. R. POWELL, *Mol. Endocrinol.*, 2, 1988, pp. 404-411.
- [27] S. SHIMASAKI, F. UCHIYAMA, M. SHIMONKA and N. LING, *Mol. Endocrinol.*, 4, 1991, pp. 1451-1458.
- [28] M. KIEFER, R. IOH, D. BAUER and J. ZAPF, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 1991, pp. 219-225.

C. M. et B. P. : Laboratoire d'Oncologie virale et moléculaire,  
 Institut Curie, Bât. n° 110, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex;  
 B. P. : Université Pierre-et-Marie-Curie, 4, place Jussieu, 75252 Paris.

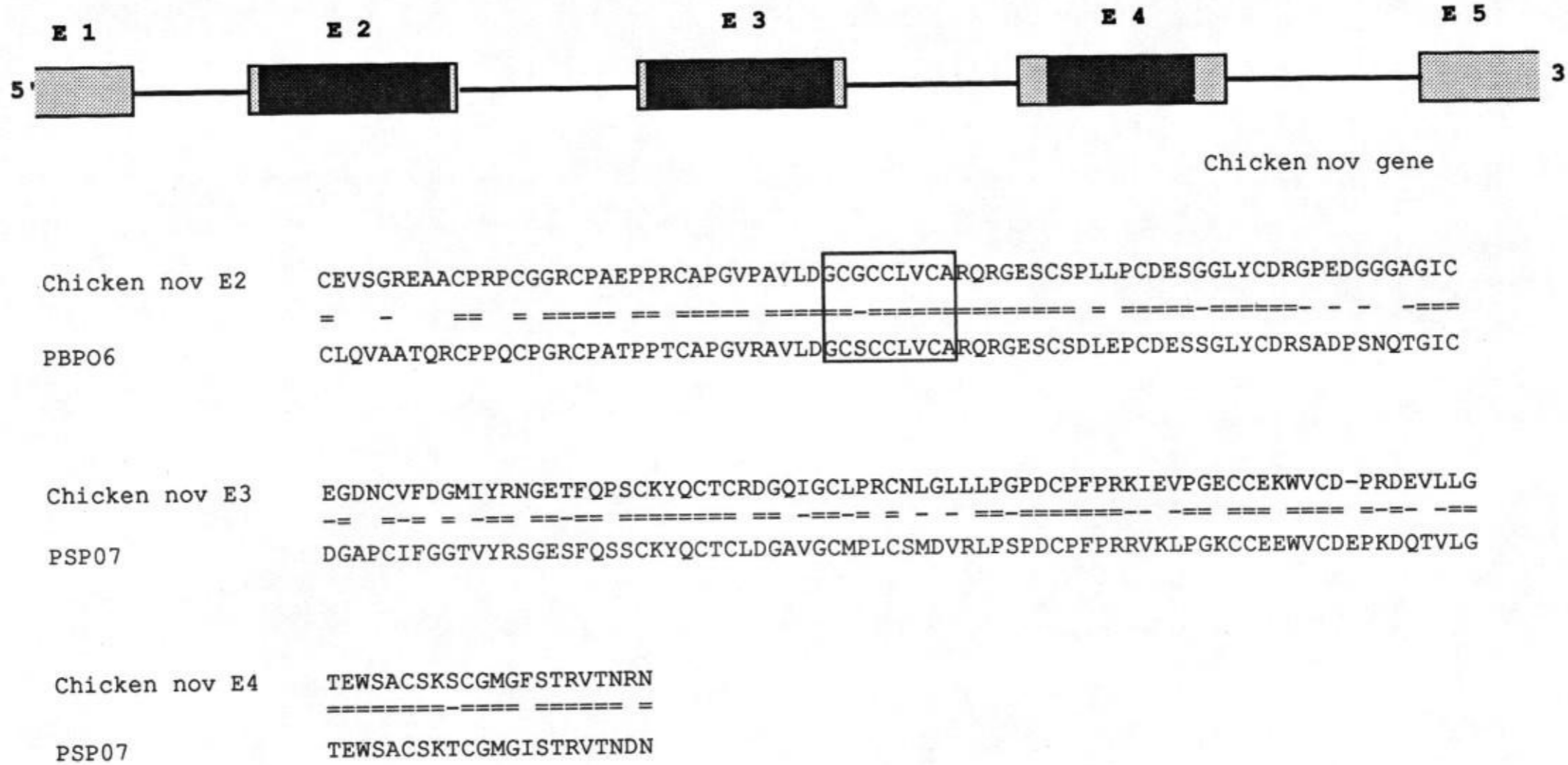


Fig. 2. — Comparison of the amino acid sequences of the PBP06 and PSP07 fragments with the chicken nov exons 2, 3 and 4. *Upper part:* The structure of the chicken nov gene is presented (V. Maloisel *et al.* submitted). Light boxes stand for chicken exons. Dark boxes stand for human homologous sequences. *Lower part:* Amino acid sequences have been aligned to provide maximal homology: =; identical amino acids; — same group of amino acids; the consensus sequence found in all IGF binding proteins described is boxed.

Fig. 2. — Comparaison des séquences en acides aminés des fragments PBP06 et PSP07 avec celle des exons 2, 3 et 4 du gène nov de Poule. Haut : la structure schématique du gène nov de Poule est représentée (V. Maloisel *et coll.*, soumis). Les boîtes claires correspondent aux exons du gène de Poule. Les boîtes foncées correspondent aux séquences humaines homologues. Bas : l'alignement des séquences en acides aminés a été réalisé selon l'homologie maximale. =, acides aminés identiques; —, acides aminés du même groupe; la séquence consensus retrouvée dans toutes les protéines liant les IGF est encadrée.



## Maturation différentielle adaptative de la provasotocine neurohypophysaire chez les amphibiens : présence de l'hydrine 2 (vasotocinyl-glycine) chez les anoures mais pas chez les urodèles

Jacqueline CHAUVET, Yves ROUILLE, Gilles MICHEL, Youssoufou OUEDRAOGO  
et Roger ACHER

**Résumé** — La présence de l'hydrine 2 (vasotocinyl-glycine), un intermédiaire de maturation de la provasotocine, a été montrée dans le lobe neurointermédiaire de l'hypophyse d'espèces amphibiennes semi-aquatiques ou terrestres appartenant à l'ordre des anoures, à savoir *Rana esculenta*, *R. temporaria*, *R. pipiens* (Ranidés) et *Bufo bufo*, *B. marinus* et *B. ictericus* (Bufonidés). Par contre l'hydrine 2 paraît absente chez les espèces appartenant à l'ordre des urodèles, comme l'axolotl *Ambystoma mexicanum* (Ambystomidés) et le triton pleurodèle *Pleurodela waltlii* (Salamandridés). Il est connu que la vasotocine stimule le transport de l'eau à travers la peau et la vessie des anoures alors qu'elle est inactive sur ces organes chez les urodèles.

### Adaptative differential processing of neurohypophysial provasotocin in amphibians: occurrence of hydrin 2 (vasotocinyl-glycine) in Anura but not in Urodela

**Abstract** — Occurrence of hydrin 2 (vasotocinyl-glycine), an intermediate in the provasotocin processing, has been shown in the neurointermediate lobe of the pituitary of semi-aquatic or terrestrial amphibian species belonging to the order Anura, namely *Rana esculenta*, *R. temporaria*, *R. pipiens* (Ranidae), and *Bufo bufo*, *B. marinus*, *B. ictericus* (Bufonidae). In contrast hydrin 2 appears absent in species belonging to the order Urodela, namely the axolotl *Ambystoma mexicanum* (Ambystomidae) and the pleurodele newt, *Pleurodela waltlii* (Salamandridae). Whereas water transport through the skin and the urinary bladder is stimulated by vasotocin and hydrin 2 in anuran species, this stimulation is known not to occur in urodele species.

**Abridged English Version** — In contrast to other vasotocin-bearers such as birds or reptiles, some amphibians have experienced a down-regulation of the pro-vasotocin processing so that an intermediate vasotocinyl-glycine (hydrin 2) is found in the neurohypophysis along with vasotocin [1]. This peptide stimulates the water transport through frog skin and frog bladder epithelia [1] as does vasotocin [2] but in contrast to vasotocin is virtually devoid of antidiuretic activity on frog kidney (unpublished results). Because hydrin 2 has been identified in frog neurosecretory granules, it is assumed to be a physiological hormone secreted in blood [3]. It has been suggested that the differential processing of provasotocin is proper to amphibians, allowing formation of two hormones from a single precursor. Water homeostasis in amphibians involves three organs, namely skin, bladder and kidney, and could be under control of both vasotocin and hydrin 2, the latter acting mainly for external water uptake through the skin.

A number of frogs and toads as well as two urodeles have been examined. Neurointermediate lobes of pituitaries have been separated for anurans but for urodeles entire pituitaries have been used. They were extracted (0.25% acetic acid, 5 min., 100°C) either directly or after desiccation of the gland in peroxide-free acetone. The extract has been centrifuged for removing insoluble material and the supernatant subjected to reverse-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) as previously described [1]. A Nucléosil C18 column (4.6 × 250 mm; particle size: 5 µm; pore size: 100 Å) was used with a linear acetonitrile

Note présentée par Jean ROCHE.

gradient (5-60%) containing 0.05% trifluoroacetic acid for 55 min. A Waters model 204 chromatograph equipped with a model U6K manual injector, a model 680 solvent programmer, a model 441 UV absorbance detector and a model 730 data module was used. Absorbance was monitored at 214 and 280 nm.

Among anuran Amphibia, *Rana pipiens* (North America), *Rana temporaria* (France), *Bufo bufo* (France), *Bufo ictericus* (South America) and *B. regularis* (Africa) have been examined (Fig. 1). As previously discovered for European *Rana esculenta* [1] and American *Bufo marinus* [4], both vasotocin and hydrin 2 can be identified by their retention times in HPLC when compared with synthetic vasotocin and vasotocinyl-glycine (Fig. 1). As a rule, hydrin 2 is somewhat more abundant than vasotocin (in a molar ratio 6 to 4).

In contrast, in two urodele species, the axolotl *Ambystoma mexicanum* (America) (Fig. 1) and the pleurodele newt *Pleurodeles waltlii* (Spain) (Figs. 2 and 3), hydrin 2 appears absent. It is known that in contrast to frogs and toads, *Urodela* have a skin and an urinary bladder that are not responsive to vasotocin [2].

Hydrin 2 has not been detected in reptiles such as the viper [4], nor in birds such as the goose [5] and up to now has been found only in semi-aquatic (*Ranidae*) or terrestrial (*Bufo*) families of *Anura*. In the permanent aquatic *Xenopus laevis* (*Pipidae*), vasotocinyl-Gly-Lys-Arg (hydrin 1) has been found along with vasotocin [1].

It is not known whether vasotocin and hydrin 2 occur in distinct neurons (vasotocinergic and hydrinergic neurons) or are present in the same cell and, if so, whether they are packed in the same neurosecretory granules. Conversion of vasotocinyl-glycine into  $\alpha$ -amidated mature vasotocin involves the sequential actions of two enzymes, a peptidylglycine hydroxylase monooxygenase and a peptidylhydroxyglycine  $\alpha$ -amidating dealkylase ([6]-[8]). The partial arrest of processing at the level of vasotocinyl-glycine implies a down-regulation of the first enzyme. Heterologue conversion "in vitro" of synthetic hydrin 2 into vasotocin through bovine neurosecretory granule enzymes has been carried out [9].

However whereas the conversion of the tripeptide D-Val-Tyr-Gly into D-Val-Tyr (NH<sub>2</sub>) can be obtained with a 70-90% yield under the conditions used, in the case of vasotocinyl-Gly the yield reaches only 5-10% as judged by appearance of oxytocic and pressor activities displayed only by mature vasotocin. It would be of interest to find experimental conditions under which the ratio hydrin 2/vasotocin in the frog neurohypophysis would be modified in order to clarify the respective functions of the two neurohypophysial peptides.

---

INTRODUCTION. — A la différence des autres vertébrés possédant la vasotocine comme les oiseaux ou les reptiles, certains amphibiens connaissent une régulation négative de la maturation de la provasotocine de sorte qu'un intermédiaire, la vasotocinyl-glycine (hydrine 2) est trouvé dans la neurohypophyse conjointement avec la vasotocine [1]. Ce peptide stimule le transport de l'eau à travers l'épithélium cutané et l'épithélium de la vessie de la grenouille comme le fait la vasotocine [2], mais à la différence de celle-ci, il est pratiquement dépourvu d'activité antidiurétique sur le rein de l'animal (résultats non publiés). L'hydrine 2 a été identifiée dans les granules de sécrétion de la grenouille et est très vraisemblablement sécrétée dans le sang [3]. Il a été suggéré que la maturation différentielle de la provasotocine, propre aux amphibiens, conduit à la formation de deux hormones à partir d'un même précurseur. L'homéostasie hydrique chez les amphibiens implique trois organes, à savoir la peau, la vessie et le rein, et pourrait être sous le

contrôle à la fois de la vasotocine et de l'hydrine 2, cette dernière agissant principalement au niveau de la peau pour la réhydratation.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — Un certain nombre de grenouilles et de crapauds ainsi que deux urodèles ont été examinés. Les lobes neurointermédiaires de l'hypophyse ont été séparés dans le cas des anoures, alors que les glandes entières ont été utilisées dans le cas des urodèles. Le tissu a été extrait (acide acétique 0,25%, 5 mn, 100°C) soit directement, soit après dessiccation de la glande dans l'acétone dépourvue de peroxydes. L'extrait a été centrifugé pour éliminer le matériel insoluble et la solution surnageante soumise à la chromatographie liquide à haute pression en phase reverse (HPLC) comme antérieurement décrit [1]. Une colonne (4,6 × 250 mm; diamètre particulaire : 5 µm; taille

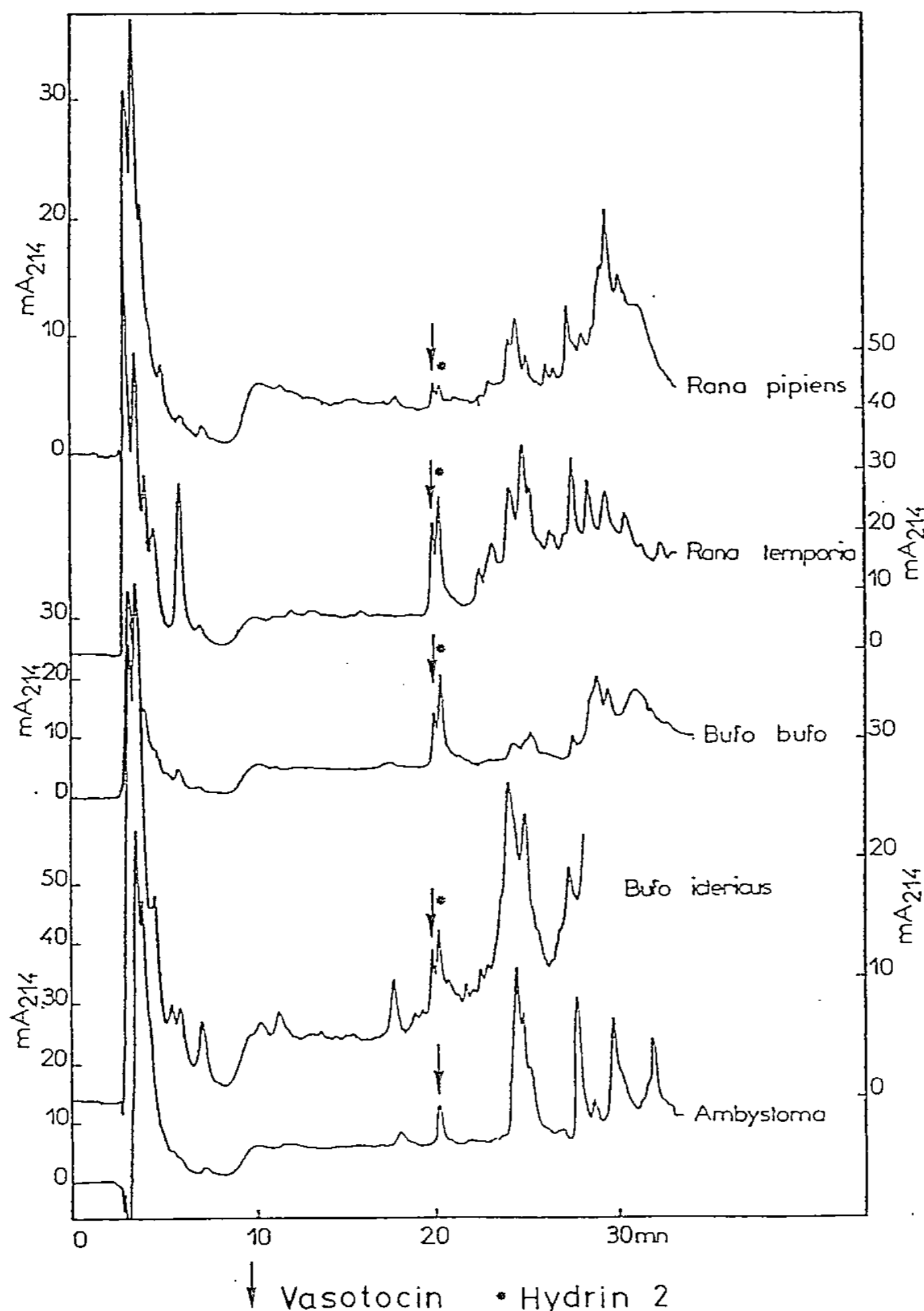


Fig. 1. — Identification de la vasotocine (flèche) et de l'hydrine 2 (étoile) dans le lobe neurointermédiaire de l'hypophyse des amphibiens anoures par HPLC. Seule la vasotocine est décelée dans l'hypophyse de l'urodèle *Ambystoma mexicanum* (gradient de solvant décrit dans le texte).

Fig. 1. — Identification of vasotocin (arrow) and hydrin 2 (star) in the neurointermediate pituitary of anuran Amphibia by HPLC. Vasotocin only is detected in the pituitary of urodele *Ambystoma mexicanum* (solvent gradient described in the text).



## NEUROHYPOPHYSIAL HORMONES OF AMPHIBIANS

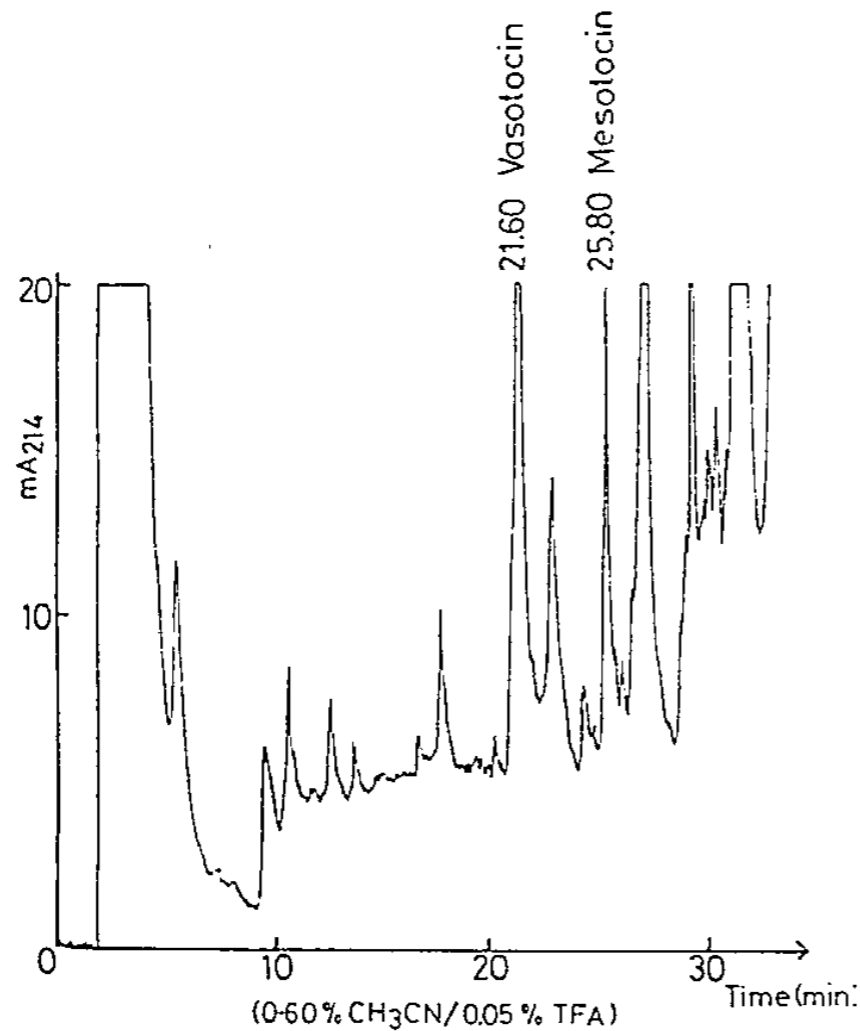
PLEURODELE NEWT (*Pleurodeles waltlii*)

Fig. 2. — Identification et isolement de la vasotocine dans l'hypophyse du triton pleurodèle (*Pleurodeles waltlii*) par HPLC (gradient de solvant décrit dans le texte).

Fig. 2. — Identification and isolation of vasotocin in the pituitary gland of the pleurodele newt (*Pleurodeles waltlii*) by HPLC (solvent gradient described in the text).

des pores : 100 Å) de Nucleosil C18 a été utilisée avec un gradient linéaire (5-60 %) d'acétonitrile contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique pendant 55 mn. Un chromatographe Waters modèle 204 équipé avec un injecteur manuel modèle U6K, un programmeur de solvant modèle 680, un détecteur d'absorption en UV modèle 441 et un enregistreur-intégrateur « data module » modèle 730, a été utilisé. L'absorbance a été mesurée à 214 et 280 nm.

Parmi les amphibiens anoures, *Rana pipiens* (Amérique du Nord), *Rana temporaria* (France), *Bufo bufo* (France), *Bufo ictericus* (Amérique du Sud) et *Bufo regularis* (Afrique), ont été examinés (fig. 1). Comme précédemment observé pour la grenouille européenne *Rana esculenta* [1] et le crapaud américain *Bufo marinus* [4], la vasotocine et l'hydrine 2 peuvent être identifiées par leur temps de rétention en HPLC par comparaison avec la vasotocine et l'hydrine 2 synthétiques (fig. 1). En règle générale, l'hydrine 2 est un peu plus abondante que la vasotocine (rapport molaire 6 à 4).

Au contraire chez deux espèces urodèles, l'axolotl *Ambystoma tigrinum* (Amérique) (fig. 1) et le triton pleurodèle *Pleurodela waltlii* (Espagne) (fig. 2 et 3), l'hydrine 2 paraît absente. Il est connu qu'à la différence des grenouilles et des crapauds, les urodèles possèdent une peau et une vessie qui ne sont pas sensibles à la vasotocine [2].

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — L'hydrine 2 n'a été décelée ni chez les reptiles comme la vipère [4], ni chez les oiseaux comme l'oie [5]. Jusqu'à présent elle n'a été identifiée que chez les familles d'anoures semi-aquatiques (*Ranidae*) ou terrestres (*Bufonidae*). Par contre chez une espèce aquatique permanente, *Xenopus laevis* (*Pipidae*), la vasotocinyl-Gly-Lys-Arg (hydrine 1) a été trouvée conjointement à la vasotocine mais l'hydrine 2 est absente [1].

On ignore si la vasotocine et l'hydrine 2 se trouvent dans des neurones différents (neurones vasotocinergiques et hydrinergiques), ou sont présentes dans la même cellule et dans ce cas, si elles sont contenues dans les mêmes granules de sécrétion. La conversion

OCCURRENCE OF VASOTOCIN AND ABSENCE OF HYDRINS  
IN PLEURODELES WALTII

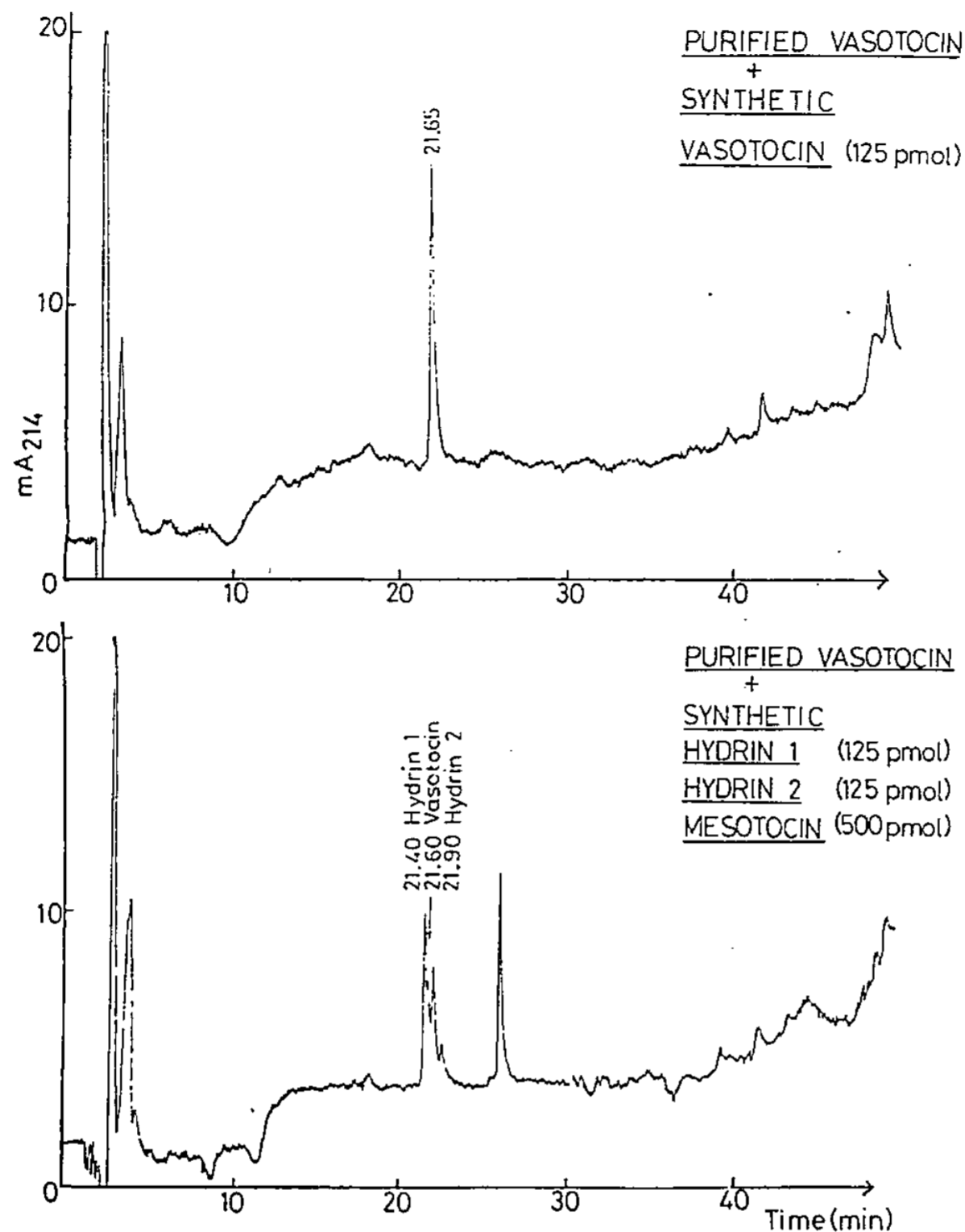


Fig. 3. — Chromatographie de la vasotocine purifiée de *Pleurodeles waltlii* avec addition de vasotocine synthétique (haut) ou d'hydrine 1, d'hydrine 2 et de mésotocine synthétique (bas) (gradient de solvant décrit dans le texte).

Fig. 3. — Chromatography of purified vasotocin from *Pleurodeles waltlii* with addition of either synthetic vasotocin (top) or synthetic hydrin 1, hydrin 2 and mesotocin (bottom) (solvent gradient described in the text).

de la vasotocinyl-glycine en vasotocine mûre  $\alpha$ -amidée implique les actions consécutives de deux enzymes, à savoir une peptidylglycine  $\alpha$ -hydroxylase monooxygénase et une peptidyl- $\alpha$ -hydroxyglycine lyase amidante ([6]-[8]). L'arrêt partiel de la maturation au niveau de la vasotocinyl-glycine est dû à une régulation négative du premier enzyme. La conversion hétérologue « *in vitro* » de l'hydrine 2 synthétique en vasotocine au moyen d'enzymes granulaires de la neurohypophyse de bœuf a été réalisée [9]. Toutefois alors que la conversion du tripeptide D-Val-Tyr-Gly en D-Val-Tyr(NH<sub>2</sub>) s'effectue avec un rendement de 70-90 %, dans les mêmes conditions le rendement de conversion avec la vasotocinyl-Gly n'atteint que 5-10 % d'après l'estimation des activités ocytotique et vasopressique apparues, activités qui ne sont manifestées que par la vasotocine mûre. Afin de clarifier les fonctions respectives de l'hydrine 2 et de la vasotocine, des conditions physiologiques dans lesquelles le rapport des concentrations neurohypophysaires est modifié sont actuellement recherchées.

Nous remercions le professeur J. Charlemagne (Lab. d'Immunologie comparée, Université de Paris-VI) et le professeur C. Houillon (Lab. de Biologie animale, Université de Paris-VI) qui ont bien voulu nous fournir respectivement *Ambystoma mexicanum* et *Pleurodela waltlii*.

We thank Prof. J. Charlemagne (Lab. d'Immunologie comparée, Université de Paris-VI) and Prof. C. Houillon (Lab. de Biologie animale, Université de Paris-VI) for the gift of *Ambystoma mexicanum* and *Pleurodela waltlii*, respectively.

Note remise le 21 mai 1991, acceptée le 14 août 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Y. ROUILLE, G. MICHEL, M. T. CHAUVET, J. CHAUVET et R. ACHER, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 1989, p. 5272-5275.
- [2] P. J. BENTLEY, in *Handbook of Physiology, Endocrinology*, IV, Part 1, H. KNOBIL et W. H. SAWYER éd., Am. Physiol. Soc. Washington DC, 1974, p. 545-563.
- [3] J. CHAUVET, Y. ROUILLE, M. T. CHAUVET et R. ACHER, *Neuroendocrinology*, 51, 1990, p. 233-236.
- [4] G. MICHEL, Y. ROUILLE, M. T. CHAUVET, J. CHAUVET et R. ACHER, *F.E.B.S. Lett.*, 264, 1990, p. 135-137.
- [5] Y. ROUILLE, B. LEVY, M. T. CHAUVET, J. CHAUVET et R. ACHER, *Neuropeptides*, 13, 1989, p. 187-190.
- [6] A. G. KATOPODIS, D. PING et S. W. MAY, *Biochemistry*, 29, 1990, p. 6115-6120.
- [7] S. N. PERKINS, E. J. HUESTEN et B. E. EIPPER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 1990, p. 926-932.
- [8] K. TAKAHASHI, H. OKAMOTO, H. SEINO et M. NOGUCHI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 169, 1990, p. 524-530.
- [9] Y. ROUILLE, J. CHAUVET et R. ACHER, *J. Neuroendocrinology*, 3, 1991, p. 15-20.

Laboratoire de Chimie biologique,  
Université de Paris-VI, C.N.R.S. (SDI 5662), 96, boulevard Raspail, 76006 Paris.

**Biosynthèse des ecdystéroïdes par les glandes prothoraciques  
de *Pieris brassicae* (Insecte Lépidoptère).  
Conversion *in vitro* d'un précurseur radioactif  
de la 3-déhydroecdysone**

Catherine BLAIS et René LAFONT

**Résumé** — Les ecdystéroïdes sécrétés *in vitro* par les glandes prothoraciques de *Pieris brassicae* ont été dosés par enzyme-immunologie, après séparation par HPLC. Les glandes libèrent à la fois de l'ecdysone et de la 3-déhydroecdysone, quantitativement majoritaire. Elles peuvent convertir *in vitro* deux précurseurs potentiels tritiés : le kétodiol est faiblement transformé en ecdysone, le 3-oxokétodiol est beaucoup plus efficacement converti, principalement en 3-déhydroecdysone tritiée. Le 3-oxokétodiol apparaît être un bon candidat comme intermédiaire de la biosynthèse des ecdystéroïdes.

**Ecdysteroid biosynthesis by prothoracic glands  
of *Pieris brassicae* (Lepidoptera, Insecta).**

**Conversion *in vitro* of a radiolabelled precursor of 3-dehydroecdysone**

**Abstract** — Ecdysteroids secreted by prothoracic glands of *Pieris brassicae* were measured by enzyme immunoassay, after HPLC separation. Both ecdysone and 3-dehydroecdysone, as a major product, are produced. Two radiolabelled putative precursors were converted by *Pieris* glands *in vitro*: [<sup>3</sup>H]ketodiol was converted into ecdysone at a low rate; [<sup>3</sup>H]3-oxoketodiol was efficiently converted, mainly into 3-dehydroecdysone. These data make 3-oxoketodiol a good candidate for an intermediate in ecdysteroid biosynthetic pathway.

**Abridged English Version** — INTRODUCTION. — Insect molting glands synthesize ecdysone from cholesterol, but the biosynthetic pathway is far from elucidated ([1], [2], [3]). It is now generally accepted that 2,22,25-trideoxyecdysone (= 5  $\beta$ -ketodiol) is an intermediate in many insects, due to its efficient conversion *in vitro* into ecdysone by prothoracic glands ([1], [2]) or ovaries [5]. Recently, however, the molting glands of several species of Lepidoptera (including *Manduca sexta*) have been shown to secrete primarily 3-dehydroecdysone ([8], [9]). The absence of detectable ecdysone oxidase activity in molting glands [10] and the presence of a 3  $\beta$ -forming-3-oxoecdysteroid reductase in hemolymph [11] leads us to consider that 3-dehydroecdysone is a precursor rather than a metabolite of ecdysone. All these data prompted us to investigate whether 3-oxoketodiol could represent an adequate intermediate in the ecdysone biosynthetic pathway in the Lepidopteran *Pieris brassicae*.

**MATERIALS AND METHODS.** — Prothoracic glands were carefully dissected from last instar larvae of *Pieris brassicae*, and incubated overnight in Grace's medium (two glands in 100  $\mu$ l). Secreted ecdysteroids were separated by normal-phase HPLC and measured by enzyme immunoassay (EIA) [5]. The antiserum anti-20-hydroxyecdysone (AS4919) and the enzymatic tracer were generous gifts of Dr. Porcheron. Calibration curves were established for both ecdysone and 3-dehydroecdysone. In our experimental conditions, cross reactivity of ecdysteroids was 2.6 for ecdysone and 42.9 for 3-dehydroecdysone (1 for 20-hydroxyecdysone).

Tritiated 3-oxoketodiol was prepared by chemical oxidation of [<sup>3</sup>H]ketodiol, and purified by normal-phase HPLC. One or the other labelled compound was added in ethanol to

Note présentée par Jules HOFFMANN.

incubation medium for conversion studies. Labelled metabolites were analyzed by reverse-phase HPLC using continuous-flow monitoring of radioactivity and labelled peaks were identified by comigration with reference compounds.

RESULTS AND DISCUSSION. — HPLC-EIA analyses showed that molting glands of *Pieris brassicae* secrete ecdysone and 3-dehydroecdysone, the latter accounting for more than 95% of the total. Thus like for most other Lepidoptera [9], *Pieris brassicae* molting glands secrete mainly 3-dehydroecdysone.

Labelled ketodiol is converted to a low extent (4.3%) into ecdysone and to a lesser extent into 2-deoxyecdysone and 22-deoxyecdysone (Fig. A). No labelled 3-dehydroecdysone is detected, and this agrees with the absence of ecdysone oxidase in molting glands [10]. These data clearly show that ketodiol is not a normal precursor in *Pieris* molting glands.

Labelled 3-oxoketodiol is more efficiently metabolized (Fig. B), mainly into 3-dehydroecdysone (24%), and, to a lesser extent, into compounds a little less polar than 2-deoxyecdysone and 22-deoxyecdysone. They could correspond to the 3-oxo forms of these ecdysteroids. Traces of ecdysone are observed in some cases, that are possibly due to the 3-oxoreductase activity present in contaminating tissues [16]. Analysis of [<sup>3</sup>H]3-oxoketodiol conversion by normal-phase HPLC confirmed comigration of the major radiolabelled compound with standard 3-dehydroecdysone (data not shown).

These data make 3-oxoketodiol a good candidate for an intermediate in the 3-dehydroecdysone biosynthetic pathway, at least in Lepidoptera. It is suggested that this could also apply to other insect species, as ancient experiments already suggested the involvement of 3-oxo- $\Delta^4$ -steroid intermediates in ecdysone biosynthesis ([1], [19]).

---

INTRODUCTION. — On considère classiquement que les glandes de mue des insectes sécrètent de l'ecdysone [1], mais les voies de biosynthèse de ce composé à partir du cholestérol sont encore loin d'être élucidées. S'il est actuellement admis que la première étape est la transformation du cholestérol en 7-déhydrocholestérol, la suite des réactions n'est pas connue (revues [2], [3]). La 2,22,25-tridésoxyecdysone (=cétodiol) est souvent considérée comme un intermédiaire vraisemblable : ce composé est efficacement transformé *in vitro* en ecdysone par les glandes de mue d'insectes ([1], [2]) ou de crustacés [4] et par des ovaires d'insectes [5], suivant une séquence privilégiée d'hydroxylations; de plus sa présence a été mise en évidence dans les ovaires du criquet *Locusta migratoria* [6]. Les glandes prothoraciques du Lépidoptère *Pieris brassicae* sont elles aussi capables de transformer le cétodiol tritié en ecdysone [7], mais le taux de conversion est faible.

Des études récentes ([8], [9]) ont montré qu'en fait les glandes prothoraciques de plusieurs espèces de Lépidoptères, dont *Manduca sexta*, sécrètent essentiellement de la 3-déhydroecdysone au lieu d'ecdysone. L'absence d'activité ecdysone oxydase dans les glandes de mue [10] et la présence d'une activité 3-oxoecdystéroïde réductase « 3  $\beta$ -forming » dans l'hémolymphe de *Manduca sexta* ([8], [11]) donnent à penser que chez cette espèce la formation de 3-déhydroecdysone précède celle d'ecdysone. Ces résultats conduisent à envisager que, dans ce cas au moins, la voie de biosynthèse procéderait via des composés 3-oxo, ainsi que cela avait d'ailleurs été postulé dans des travaux antérieurs [1]. Dans ce contexte, il nous a semblé que la forme 3-oxo du cétodiol, le 3-oxocétodiol, pourrait représenter un précurseur potentiel de la 3-déhydroecdysone. C'est pourquoi, après avoir mis en évidence la sécrétion de 3-déhydroecdysone par les glandes protho-

raciques de *Pieris brassicae*, nous avons analysé leur capacité à convertir *in vitro* le 3-oxocétodiol tritié.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — Les expériences ont été réalisées sur des chenilles du dernier stade de *Pieris brassicae* L. (Lépidoptères, Piéridés) qui nous ont été fournies par M. Brachet (I.N.R.A., Jouy-en-Josas).

**Réactifs.** — L'ecdysone provient de Simes; la 3-déhydroecdysone a été préparée par synthèse chimique [12]. La 2,22,25-tridésoxyecdysone tritiée (ou 5 $\beta$ -cétodiol) a été préparée suivant la technique de Haag et coll. [13] (activité spécifique : 3,7 TBq/mmol). Le 3-oxocétodiol tritié a été obtenu en oxydant du cétodiol par une solution de chlorochromate de pyridinium dans du dichlorométhane. Il a été ensuite purifié par HPLC sur une colonne Zorbax-SIL (DuPont), solvant isooctane : isopropanol : eau (700 : 100 : 4, v/v/v). Dans ces conditions, avec un débit de 1 ml/mn, les temps de rétention sont de 8,6 et 5,7 mn, respectivement pour le cétodiol et sa forme 3-oxo.

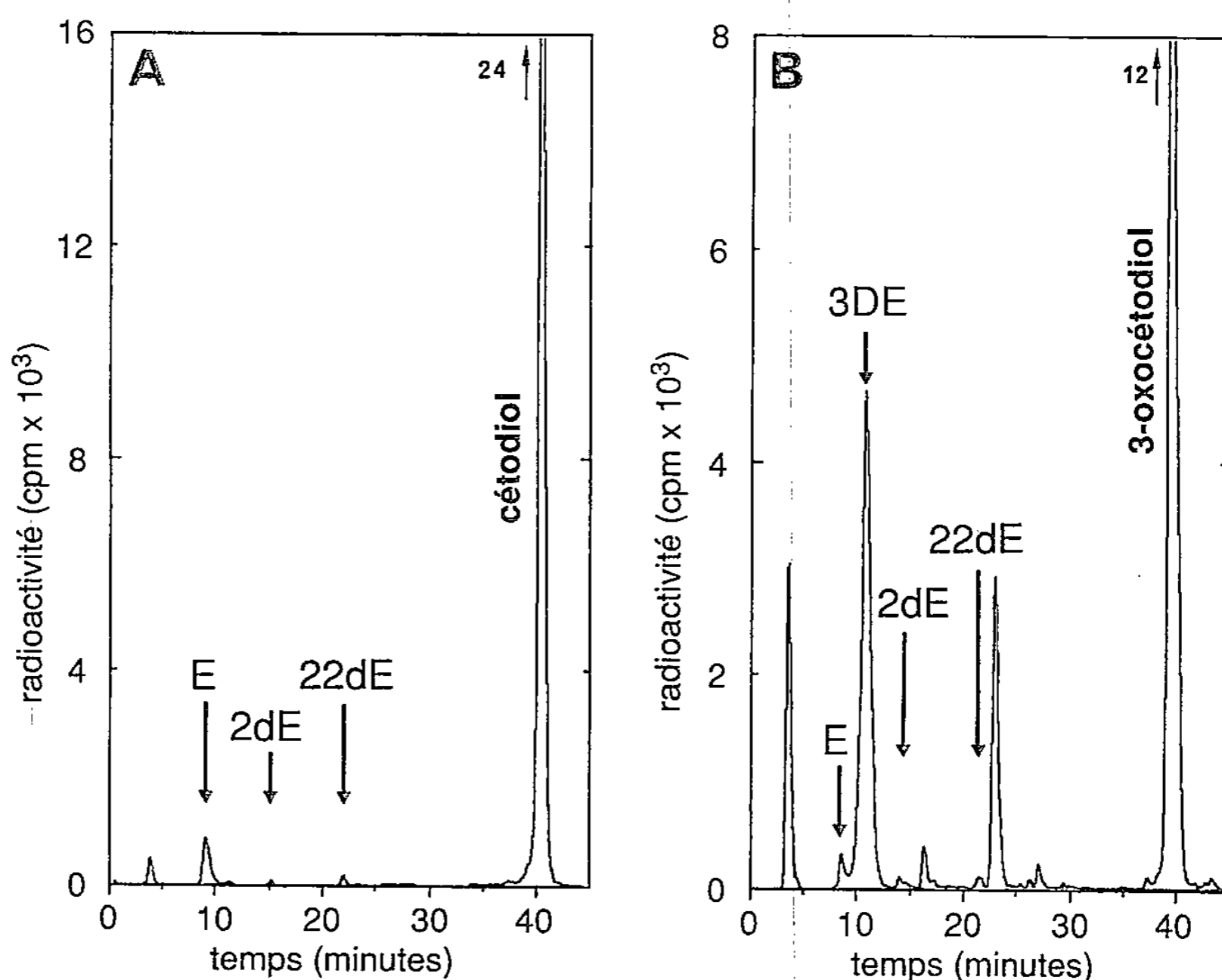
**Incubation des glandes prothoraciques.** — Après dissection, les glandes prothoraciques sont rincées dans une solution saline et débarrassées de tout corps gras, puis incubées dans du milieu de Grace (Viotech) (deux glandes dans 100  $\mu$ l), à 23-24°C, sous agitation constante, pendant une nuit.

**Analyse des ecdystéroïdes libérés dans le milieu.** — Les glandes prothoraciques ont été prélevées sur des chenilles en phase de migration, correspondant au début du pic hémolympatique d'ecdystéroïdes [14]. Les milieux d'incubation de plusieurs glandes (six ou huit) ont été regroupés et extraits deux fois par du méthanol. Les ecdystéroïdes ont été séparés par HPLC sur une cartouche Radial-Pak 8Si 5 $\mu$ m (Waters) éluée avec le mélange isooctane : isopropanol : eau (100 : 40 : 3), à un débit de 1 ml/mn. Des fractions de 1 ml ont été collectées, évaporées à sec pour être dosées par EIA. Le rendement mesuré après HPLC varie entre 60 et 87 % (utilisation de 20-hydroxyecdysone radioactive comme standard interne).

Le dosage EIA des ecdystéroïdes (chaque échantillon en double) a été réalisé suivant la technique de Porcheron [15], qui nous a donné l'antisérum anti-20-hydroxyecdysone (AS4919), et le traceur enzymatique. Dans nos conditions expérimentales, le taux de croisement de l'anticorps (concentration de l'ecdystéroïde divisée par concentration du ligand 20-hydroxyecdysone à 50 % B/Bo) est de 2,6 pour l'ecdysone et de 42,9 pour la 3-déhydroecdysone.

**Analyse de la conversion des précurseurs radioactifs.** — Le cétodiol ou le 3-oxocétodiol tritié (environ 74 kBq) est ajouté dans 1  $\mu$ l d'éthanol au milieu d'incubation des glandes. Les produits de conversion ont été analysés par HPLC sur une cartouche Nova-Pak C<sub>18</sub> (Waters), éluée avec un gradient linéaire (25 à 100 % en 35 mn, puis 100 % pendant 10 mn) d'acétonitrile : isopropanol (100 : 40) dans l'acide trifluoroacétique à 0,1 % dans l'eau. La radioactivité est mesurée en continu par un compteur-intégrateur Flo-One Beta A-200 (Radiomatic). Ce système ne sépare pas le cétodiol du 3-oxocétodiol.

**RÉSULTATS.** — *I. Analyse des ecdystéroïdes libérés par les glandes prothoraciques.* — Le dosage EIA des fractions obtenues par HPLC met en évidence deux pics d'immunoréactivité, correspondant aux temps de rétention de la 3-déhydroecdysone et de l'ecdysone. Exprimée en équivalents ecdysone, la quantité de 3-déhydroecdysone est toujours supérieure à celle de l'ecdysone, soit pour deux glandes, pendant 15 h d'incubation : 260 pg ( $\pm$  60) contre 100 pg ( $\pm$  30) pour l'ecdysone (moyenne  $\pm$  écart-type sur trois



Analyse par HPLC en phase inverse de la conversion *in vitro* de cétodiol (A) et de 3-oxocétodiol (B) tritiés par les glandes prothoraciques de *P. brassicae*. Ecdystéroïdes standards (flèches) : E, ecdysone; 3DE, 3-déhydroecdysone; 2dE, 2-désoxyecdysone; 22dE, 22-désoxyecdysone.

*Reverse-phase HPLC analysis of [<sup>3</sup>H]ketodiol (A) and [<sup>3</sup>H]3-oxoketodiol (B) conversion in vitro by P. brassicae prothoracic glands. Standard ecdysteroids are indicated by arrows.*

échantillons différents). Si l'on tient compte du taux de croisement de l'anticorps pour la 3-déhydroecdysone, on constate que celle-ci représente en fait plus de 95 % des ecdystéroïdes sécrétés par les glandes.

*II. Conversion de précurseurs potentiels tritiés.* — Le cétodiol tritié est converti principalement en un composé de même temps de rétention que l'ecdysone (*fig. A*), représentant 4,3 % de la radioactivité totale (3 à 10 % selon les expériences). Deux composés mineurs comigrent avec la 2-désoxyecdysone et la 22-désoxyecdysone.

Le [<sup>3</sup>H]3-oxocétodiol est transformé en plusieurs métabolites tritiés détectables par analyse HPLC (*fig. B*) : un premier pic (très réduit) comigre avec l'ecdysone, un second pic majeur (24 % de la radioactivité) comigre avec la 3-déhydroecdysone, deux autres composés tritiés, mineurs, sont un peu moins polaires que la 2-désoxyecdysone et la 22-désoxyecdysone, respectivement. Ils pourraient correspondre aux formes 3-oxo de ces derniers, mais ce seul critère chromatographique n'est pas suffisant pour assurer leur identification. L'analyse de la conversion du [<sup>3</sup>H]3-oxocétodiol en HPLC sur colonne de phase directe a confirmé la comigration du métabolite tritié majeur avec la 3-déhydroecdysone de référence (résultats non montrés).

**DISCUSSION.** — La glande prothoracique des larves de *Pieris brassicae* sécrète donc deux ecdystéroïdes qui ont le même comportement chromatographique que l'ecdysone et la 3-déhydroecdysone, cette dernière étant quantitativement majoritaire. Ce résultat s'accorde avec ceux précédemment obtenus [9] chez différents Lépidoptères.

Le cétodiol tritié est converti en ecdysone par les glandes prothoraciques de *P. brassicae*, mais aucune trace de 3-déhydroecdysone tritiée n'a été détectée, ce qui confirme que les glandes de mue ne contiennent pas d'ecdysone oxydase. Ce seul résultat aurait pu conduire à des conclusions erronées sur la nature des produits sécrétés et sur le rôle d'intermédiaire potentiel du cétodiol dans la biosynthèse des ecdystéroïdes chez *P. brassicae*, la voie conduisant à la 3-déhydroecdysone n'étant pas du tout révélée. Cette remarque peut s'appliquer à toutes les espèces dont les glandes sécrètent de la 3-déhydroecdysone, et montre les limites dans l'usage du cétodiol marqué.

A partir du 3-oxocétodiol tritié, de l'ecdysone est formée, mais à un taux très faible. Cette conversion n'a pas été retrouvée dans des incubations réalisées ultérieurement et pourrait donc être due à une contamination des glandes par du corps gras qui, comme de nombreux tissus, contient une 3-oxoecdystéroïde réductase « 3  $\beta$ -forming » [16]. Le 3-oxocétodiol tritié est efficacement converti, principalement en 3-déhydroecdysone, produit majeur de sécrétion de la glande. Une conversion du 3-oxocétodiol en 3-déhydroecdysone et en ecdysone a été également obtenue avec des glandes de mue de *Locusta migratoria* [17] et de *Carcinus maenas* (résultat non publiés), alors que la 3-déhydroecdysone n'est pas détectable dans les produits de sécrétion des organes Y du crabe [18]. Ceci semble indiquer dans ces deux cas la présence d'une activité 3-oxoréductase, s'exerçant vis-à-vis de la 3-déhydroecdysone et/ou de ses précurseurs.

La formation, lors de la biosynthèse de l'ecdysone, d'intermédiaires 3-oxo- $\Delta^4$  a été postulée de longue date (voir [1]). Ce point redevient d'actualité [19] avec la découverte de la synthèse de 3-déhydroecdysone par les glandes de mue des Lépidoptères [9] et celles de certains crustacés [20]. Dans ce contexte, nos résultats montrent que le 3-oxocétodiol est un bon candidat pour représenter un intermédiaire de la biosynthèse, y compris chez les espèces dont les glandes de mue produisent de l'ecdysone.

Note remise le 9 juillet 1991, acceptée le 26 juillet 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] H. H. REES, In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, G. A. KERKUT et L. I. GILBERT éd., Pergamon Press, Oxford, 7, 1985, p. 249-293.
- [2] H. H. REES, In: *Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action*, J. KOOLMAN éd., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1989, p. 152-160.
- [3] J. T. WARREN et C. HETRU, *Invert. Reprod. Devel.*, 18, 1990, p. 91-99.
- [4] F. LACHAISE, M. F. MEISTER, C. HETRU et R. LAFONT, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 45, 1986, p. 253-261.
- [5] C. KAPPLER, F. GOLTZENE, M. LAGUEUX, C. HETRU et J. A. HOFFMANN, *Int. J. Invert. Reprod. Devel.*, 9, 1986, p. 17-34.
- [6] C. HETRU, C. KAPPLER, J. A. HOFFMANN, R. NEARN, L. BANG et D. H. S. HORN, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 26, 1982, p. 51-80.
- [7] C. BLAIS et F. LACHAISE, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 82, 1991, p. 224.
- [8] J. T. WARREN, S. SAKURAI, D. B. ROUNTREE, L. I. GILBERT, S.-S. LEE et K. NAKANISHI, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 1988, p. 958-962.
- [9] S. KIRIISHI, D. N. ROUNTREE, S. SAKURAI et L. I. GILBERT, *Experientia*, 46, 1990, p. 716-721.
- [10] L. I. GILBERT, In: *Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action*, J. KOOLMAN éd., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1989, p. 448-471.
- [11] S. SAKURAI, J. T. WARREN et L. I. GILBERT, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 10, 1989, p. 179-197.
- [12] J.-P. GIRAULT, C. BLAIS, P. BEYDON, C. ROLANDO et R. LAFONT, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 10, 1989, p. 199-213.
- [13] T. HAAG, C. HETRU, Y. NAKATANI, B. LUU, L. PICHAT, M. AUDINOT et M. MEISTER, *J. Label. Compound Radiopharm.*, 22, 1985, p. 547-557.



- 
- [14] R. LAFONT, B. MAUCHAMP, J. L. PENNETIER, P. TARROUX, L. DE HYS et J.-P. DELBECQUE, *Experientia*, 31, 1975, p. 1241-1242.
- [15] P. PORCHERON, M. MORINIÈRE, J. GRASSI et P. PRADELLES, *Insect Biochem.*, 19, 1989, p. 117-122.
- [16] C. BLAIS et R. LAFONT, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 365, 1984, p. 809-817.
- [17] J.-P. ROUSSEL, C. SCHWAB, C. DOLLE, C. KAPPLER et C. HETRU, 10<sup>e</sup> Colloque de Physiologie de l'Insecte, Toulouse, septembre 1990.
- [18] F. LACHAISE, G. CARPENTIER, G. SOMMÉ, J. COLARDEAU et P. BEYDON, *J. Exp. Zool.*, 252, 1989, p. 283-292.
- [19] M. L. GRIENEISEN, J. T. WARREN, S. SAKURAI et L. I. GILBERT, *Insect Biochem.*, 21, 1991, p. 41-51.
- [20] E. SPAZIANI, H. H. REES, W. L. WANG et R. D. WATSON, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 66, 1989, p. 17-25.

---

*Biochimie et Physiologie du Développement, C.N.R.S.-U.R.A. 686,  
École normale supérieure, 46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05.*

## Influence du milieu d'entretien et de la concentration en saccharose sur la production d'acide rosmarinique par des suspensions cellulaires de Sauge (*Salvia officinalis* L.)

Isabelle HIPPOLYTE, Bernard MARIN, Jean-Claude BACCOU et Robert JONARD

**Résumé** – Des suspensions cellulaires de Sauge officinale (*Salvia officinalis* L.) produisent de l'acide rosmarinique (AR), un antioxydant naturel. Nous avons tout d'abord observé la croissance et la production d'AR sur différents milieux d'initiation et d'entretien des souches. Nous avons ensuite étudié ces paramètres sur les mêmes milieux enrichis en saccharose. Les résultats présentés montrent que le milieu le plus favorable dans les conditions d'entretien n'est pas le plus intéressant pour la phase de production en conditions optimisées.

### Influence of maintenance medium and sucrose concentration on the rosmarinic acid production by cell suspension culture of sage (*Salvia officinalis* L.)

**Abstract** – Rosmarinic acid (RA) is a natural antioxidant produced by cell suspension cultures of Sage (*Salvia officinalis* L.). Kinetics of growth and production were first observed on different routine media. The effects of increase in sucrose in those different media were then studied. Results show that the medium most favourable for maintenance conditions is not the best for the production phase in optimal conditions.

**Abridged English Version** – Rosmarinic acid is a natural antioxidant in numerous Labiatae [2]. Cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.) produce the metabolite. The article discusses the behaviour (growth and production of RA) of cell suspensions in three initiation and culture media and then on the same media enriched with sucrose.

**MATERIAL AND METHODS.** – Leaves of sage cultured *in vitro* were used to initiate callus and then cell cultures on different media:

– Medium B5A : Gamborg's B5 medium [5] complemented with 2.26  $\mu\text{M}$  2,4-D and 2.32  $\mu\text{M}$  kinetin.

– Medium MSA : Murashige and Skoog's inorganic medium [6] (MS) complemented with 2.26  $\mu\text{M}$  2,4-D and 2.32  $\mu\text{M}$  kinetin.

– Medium MSB : Murashige and Skoog's inorganic medium (MS) complemented with 2.07  $\mu\text{M}$  pichloram (auxinic substance) and activated plant charcoal 50  $\text{mg.l}^{-1}$  to limit oxidation [10].

88 mM sucrose (w/v) and Nitsch *et al.* vitamins [7] were added to the three media. The pH was adjusted to 5.3. The effect of sucrose was observed by increasing the content to 146 mM in the culture medium.

Growth was estimated as a percentage increase in dry weight in relation to the initial mass. 100% growth was determined by the suspension in which the growth factor was greatest.

Freeze-dried preparations were used for three 20-min. extractions in ethanol 70%. The extract obtained was evaporated to dryness and resuspended in pure methanol. The samples were analysed by HPLC at 328 nm in a C-18 DB column (SUPELCO, U.S.A.) with a flow

---

Note présentée par Alexis MOYSE.

rate of  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . The eluent was a mixture of acetic acid/methanol/water. 5% acetic acid was used. The water-methanol gradient varied from 85-10% to 0-95%. Analysis time was 25 min. RA was not excreted in the medium with this cell suspension and was consequently extracted and assayed [8]. Each value is the average of 3 replicates.

EVOLUTION OF GROWTH AND PRODUCTION UNDER MAINTENANCE CONDITIONS. — Figures 1 and 2 show that growth and production maxima were reached most rapidly on MSB medium. Growth and production of RA were strongest on B5 A medium. The growth and production cycle was longest on MSA medium. Under these maintenance conditions, medium B5 A appears to be the most favourable since growth and RA production were highest.

THE EFFECTS OF SUCROSE ENRICHMENT OF THE MEDIUM. — The behaviour of the suspensions was different with increased sucrose [5] in comparison with maintenance conditions. Maximum RA production on the three culture media (Fig. 4) increased in comparison with standard conditions. In all cases, the increases in sucrose concentration resulted in a delay in the production phase which can be related in part to the delay in the start of growth (B5 A medium) or a change in cell behaviour (media MSA and MSB where production starts only after the end of growth) ([14] to [17]).

In contrast (Fig. 3), the position as regards growth is less clear-cut. Maximum growth was reduced on B5 A medium, was little modified on MSA and MSB media. However, the growth cycle was shortened on medium MSA and lengthened on medium MSB.

CONCLUSIONS. — Various comments can be made on the results described here. Firstly, the initiation and maintenance media affect cell cultures, especially through the mineral or hormonal nature of the culture; this was observed to a considerable extent in the cell cultures ([14], [18], [19]). Growth appeared to be particularly affected by the composition of the culture medium. The hormone composition appears to play a smaller role.

Response to changes in the sucrose content depends on the species and the medium used ([12], [13]). For *Coleus blumei*, 0.2 M sucrose gave the best production of B5 medium without growth hormones [3]. The best production from cell suspensions of *Anchusa officinalis* was obtained with 88 mM sucrose on B5 medium containing phytohormones [9]. Increase in the sucrose content in the suspensions described here lengthened the production cycle and increased RA production [11] in all cases. However, the extent of the variations depended on the culture medium. It is not possible to interpret this difference in response, but it does show clearly that the choice of culture medium for the maintenance of cell strains should be made in the light of the subsequent response to optimization trials. Thus, B5 medium appears to be the most favourable for the growth and production of RA under maintenance conditions whereas medium MSB gives the most rapid and plentiful RA production under optimization conditions.

INTRODUCTION. — L'acide rosmarinique (AR) est un antioxydant naturel issu de la voie des phénylpropanoïdes [1]. Il est présent chez de nombreuses Labiées. La Sauge officinale en contient [2]. Nous avons essayé de le faire produire par des suspensions cellulaires. Les résultats que nous relatons ici concernent l'influence de trois milieux d'initiation et d'entretien des souches sur la croissance et la production d'AR, ainsi que l'effet sur un cycle de culture de la modification d'un élément du milieu de culture, à savoir l'augmentation de la concentration en saccharose. L'AR est un métabolite secondaire produit également par des suspensions cellulaires de *Coleus blumei* [3] et

d'*Anshusa officinalis* [4]. Pour ce métabolite, les différents auteurs utilisent classiquement comme milieu d'entretien un milieu minéral B5 de Gamborg modifié. Notre objectif est de déterminer si la nature du milieu d'entretien peut induire un état physiologique favorable à une augmentation de la production d'AR, lors de l'étape finale de production sur un milieu partiellement optimisé (enrichi en saccharose).

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — A partir de feuilles de Sauge cultivée *in vitro* nous avons initié des cals puis des cultures cellulaires sur différents milieux :

— un milieu B5 A : le milieu B5 de Gamborg [5] additionné de 2,26  $\mu\text{M}$  2,4-D et de 2,32  $\mu\text{M}$  kinétine;

— un milieu MS A : le milieu minéral de Murashige et Skoog [6] (MS) additionné de 2,26  $\mu\text{M}$  2,4-D et de 2,32  $\mu\text{M}$  kinétine;

— un milieu MS B : le milieu minéral de Murashige et Skoog (MS) additionné de 2,07  $\mu\text{M}$  picloram (molécule à pouvoir auxinique) et de 50  $\text{mg.l}^{-1}$  de charbon végétal activé pour limiter les oxydations.

Dans ces trois milieux nous avons ajouté du saccharose à 88 mM et les vitamines de Nitsch et coll. [7]. Le pH est ajusté à 5,3.

L'effet du sucre a été observé sur un cycle de culture. Dans ces conditions, nous avons amené la concentration en saccharose à 146 mM.

Les cultures sont entretenues en erlenmeyers sur agitateur rotatif (20  $\text{tr.mn}^{-1}$  en lumière continue (24 à 38  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) à 23°C. Tous les 14 jours pour les cultures sur milieu MS A et B et tous les 10 jours pour les cultures sur milieu B5, 30 ml de suspensions sont transférés dans 80 ml de nouveau milieu (ou 60 ml dans 160 ml). Les cals sont transférés en milieu liquide 4 à 6 mois après la mise en culture. Les suspensions cellulaires sont âgées de 8 à 12 mois.

Pour la partie analytique, des parties aliquotes sont prélevées tous les 5 jours. Les suspensions sont filtrées sous vide puis refroidies à l'azote liquide, lyophilisées pendant 2 jours. Ensuite, la masse sèche est déterminée.

Les résultats de la croissance sont estimés en pourcentage de masse sèche en référence à la masse initiale. Le 100 % de croissance est déterminé par la suspension dont le taux de croissance est le plus important. Dans les figures 1 et 3, c'est ainsi qu'est défini le pourcentage de matière sèche.

Dans nos suspensions cellulaires, l'AR n'est pas excrété dans le milieu. Par conséquent, il est extrait, puis dosé [8]. A partir des lyophilisats, trois extractions de 20 mn chacune sont réalisées dans de l'éthanol à 70 %. L'extrait obtenu est évaporé à sec, puis repris dans du méthanol pur. Les échantillons sont analysés par HPLC à 328 nm sur une colonne C-18 DB (SUPELCO, U.S.A.). Le débit est de 1  $\text{ml.mn}^{-1}$ . L'éluant est un mélange acide acétique/méthane/eau. L'acide acétique est utilisé à 5 %, le gradient eau-méthanol varie en pourcentage de 85-10 % à 0-95 %. Le temps d'analyse est de 25 mn.

Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — *Évolution de la croissance et de la production d'acide rosmarinique dans des conditions d'entretien.* — La figure 1 nous montre tout d'abord que dans les conditions d'entretien éprouvées, la croissance des suspensions varie en fonction du milieu de culture. En effet, les maximums de croissance diffèrent selon les milieux, le plus tôt étant obtenu pour MS B (10 j) le plus tard pour MS A (20 j), le milieu B5 A étant intermédiaire. Par contre, la croissance est largement favorisée sur le milieu B5 A puisqu'elle est deux fois supérieure à celle des autres milieux. Ce milieu

d'entretien est donc tout à fait favorable à la croissance des suspensions cellulaires de Sauge.

Dans des conditions d'entretien éprouvées pour les souches utilisées, nous voyons ici que la production (*fig. 2*) est favorisée sur le milieu B5A puisqu'elle atteint 0,5 g/l au bout de 20 jours. Le maximum est atteint plus précocement (10 jours) sur le milieu MSB mais il est inférieur ( $0,32 \text{ g.l}^{-1}$ ). Enfin, c'est le milieu MSA qui se montre le moins favorable ( $0,53 \text{ g.l}^{-1}$  synthétisés en 30 jours).

La différence entre le milieu MSA et B5A porte essentiellement sur la composition azotée du milieu de culture. En effet, le milieu B5 de Gamborg contient essentiellement des ions nitrates comme source azotée ( $35 \text{ mM NO}_3^-$  contre  $2 \text{ mM NH}_4^+$ ), le milieu MS contenant des ions ammonium associés à des ions nitrates ( $39 \text{ mM NO}_3^-$  et  $21 \text{ mM NH}_4^+$ ). Si la production est peu affectée par la nutrition azotée, la croissance est favorisée par une concentration en azote peu élevée et/ou représentée essentiellement par des ions nitrates. Une telle conclusion peut être illustrée par les travaux de De-Eknamkul et Ellis [9]. Ces auteurs utilisent comme milieu d'entretien un milieu B5 dont la concentration en ions nitrates est ramenée à  $15 \text{ mM}$  pour la production d'AR par des suspensions cellulaires d'*Anchusa officinalis* L.

Pour ce qui concerne les différences obtenues en fonction de la nature des hormones, le pichloram active le métabolisme cellulaire, les maximums de croissance et de production étant atteint rapidement (10 jours). Cependant ces maximums sont inférieurs à ceux observés sur le milieu contenant du 2,4-D et de la kinétine (MSA). Sur des cals de Bananier, l'utilisation de pichloram et de charbon végétal activait également le métabolisme en provoquant une prolifération cellulaire intense [10].

*Effets de l'enrichissement du milieu en saccharose sur la croissance et la production d'acide rosmarinique.* — L'augmentation de la concentration en élément carboné est souvent favorable à la production de métabolites issus de la voie des phénylpropanoïdes [1]. Sur nos cultures, l'augmentation du saccharose est un facteur d'optimisation [11]. C'est pourquoi, nous avons dans nos expériences amené la concentration du saccharose de  $88$  à  $146 \text{ mM}$  dans nos milieux MSA, MSB et B5.

Pour ce qui concerne la croissance, l'effet le plus notable de l'augmentation de la concentration en saccharose est enregistré sur le milieu B5A. La figure 3 nous montre que le cycle de croissance est augmenté significativement avec un maximum atteint au bout de 60 jours. Dans ce cas, nous observons une phase de latence non décelable sur le milieu contenant du saccharose  $88 \text{ mM}$ . Cependant, le maximum de croissance sur ce milieu est inférieur à celui observé dans le milieu témoin. Sur le milieu MSA, la cinétique de croissance est peu modifiée. Nous notons une activation du métabolisme avec un maximum atteint précocement. Enfin, sur le milieu MSB enrichi, nous remarquons un allongement du cycle de croissance, sans modification de maximum. Nous observons une augmentation importante du pourcentage de matière sèche pendant les 5 premiers jours. Ce pic n'est pas dû à une valeur aberrante puisque nous le retrouvons pour les trois essais correspondant à cette expérience.

La production est considérablement accrue sur les trois milieux étudiés. Cependant sur le milieu B5A, le temps de production maximal est extrêmement élevé (60 jours). Par contre, le milieu MSB est le plus favorable puisqu'il nous permet d'obtenir la production la plus forte, dans le temps minimal (20 jours).

Dans tous les cas, l'augmentation de la concentration en saccharose provoque un retard de la phase de production qui peut être lié en partie au retard du début de

croissance (milieu B5 A) ou à une modification du comportement cellulaire (milieux MS A, MS B) où la production ne commence qu'après l'arrêt de croissance.

L'effet de l'augmentation de la concentration en saccharose sur la production est très important, puisque pour les trois milieux étudiés, la production est augmentée entre 5 et 11 fois, atteignant  $3,8 \text{ g.l}^{-1}$  en 25 jours pour le milieu contre  $0,75 \text{ g.l}^{-1}$  au maximum dans les conditions d'entretien pour le milieu B5 A. Cet effet du saccharose peut être attribué à son action sur le métabolisme cellulaire. On sait que l'augmentation de la concentration en saccharose s'accompagne d'une diminution du volume cellulaire [12] avec dans certains cas une augmentation du nombre de cellules [13]. Cette élévation engendre également une augmentation de la pression osmotique dans le milieu de culture. La première réponse au stress osmotique paraît être une activation des ATPases membranaires et une extrusion de protons. Elle s'accompagne d'une acidification du milieu externe [14] et de modification de la différence de potentiel membranaire ([15], [16]). Une telle situation peut provoquer des modifications de l'absorption des ions et des molécules. Cela a été décrit pour les sucres [17]. La réponse aux modifications de la concentration en saccharose dépend de l'espèce et du milieu utilisé. Pour *Coleus blumei*, une concentration de saccharose de l'ordre de 0,2 M permet la meilleure production sur un milieu B5 sans hormones de croissance [3] sur des suspensions cellulaires d'*Anchusa officinalis*. Toutefois, dans ce cas, la meilleure production est obtenue avec une concentration en saccharose de 88 mM sur un milieu B5 contenant des phytohormones [9],

CONCLUSIONS. — De l'ensemble des résultats présentés dans cette Note, nous pouvons dégager tout d'abord que le milieu d'initiation et d'entretien des souches influence un comportement des cultures cellulaires particulier en relation avec la nature minérale ou hormonale du milieu de culture, phénomène largement observé sur les cultures cellulaires ([18], [19]). La croissance est dans notre cas particulièrement affectée par la composition azotée du milieu de culture. La composition hormonale est moins déterminante.

L'augmentation de la concentration en saccharose a provoqué, dans nos conditions de culture, des modifications importantes. Elle permet dans tous les cas une augmentation de la production d'AR (de 5 à 11 fois la production maximale en conditions d'entretien). Nous observons également un allongement du cycle de croissance et de production, et dans certains cas une modification de la croissance et de la production (apparition de phases de latence, modification de la production d'AR qui de parallèle à la croissance, devient consécutive à celle-ci), montrant que le mode de production, dans notre cas, n'est pas dépendant de la nature de la suspension cellulaire mais de celle du milieu de culture.

D'un point de vue pratique, les différences de réponses obtenues montrent de façon nette que la sélection d'un milieu de culture pour l'entretien de souches cellulaires doit être réalisée en tenant compte de la réponse ultérieure à des essais d'optimisation. Ainsi, sur nos suspensions cellulaires, le milieu B5, classiquement utilisé comme milieu d'entretien pour la production d'AR par des suspensions cellulaires végétales, est effectivement le plus favorable pour la croissance et la production d'AR dans des conditions d'entretien. Par contre, c'est le milieu MS B qui permet l'obtention la plus rapide et la plus importante d'AR dans des conditions de production sur un milieu modifié.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. K. IBRAHIM, in *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, 4, F. CONSTABEL et I. K. VASIL. éd., Academic Press Inc., Orlando. 1987, p. 77-96.
- [2] V. E. HARTMANN, P. RACINE, J. GARNERO et Y. TOLLARD D'AUDIFFRET, *Rivista Ital. E.P.P.O.S.*, LXIII, 3, 1981, p. 171-177.
- [3] M. H. ZENK, H. EL-SHAGI et B. ULBRICH, *Naturwissenschaften*, 64, 1977, p. 585-586.
- [4] W. DE-EKNAMKUL et B. E. ELLIS, *Plant Cell Rep.*, 4, 1985, p. 50-53.
- [5] O. N. GAMBORG, R. MILLER et K. OJIMA, *Exptl. Cell. Res.*, 50, 1968, p. 151-158.
- [6] T. MURASHIGE et F. SKOOG, *Physiol. Plant.*, 15, 1962, p. 473-497.
- [7] J. P. NITSCH, C. NITSCH et S. HAMON, *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 266, série D, 1968, p. 369-372.
- [8] I. HIPPOLYTE, *Thèse Doctorat, Spécialité Biol. Org. Pop.*, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 1980, 227 p.
- [9] W. DE-EKNAMKUL et B. E. ELLIS, *Plant Cell Rep.*, 4, 1985, p. 46-49.
- [10] J. V. ESCALANT, *Thèse Doctorat, Spécialité Biologie et Physiologie végétale*, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 1987, 179 p.
- [11] I. HIPPOLYTE, B. MARIN, J. C. BACCOU et R. JONARD, *Plant Cell Report*, 1991 (soumis).
- [12] S. TAKAYAMA, M. MISAWA, K. KO et T. MISATO, *Physiol. Plant.*, 41, 1977, p. 313-320.
- [13] M. SAKUTA et A. KOMAMINE, in *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, 4, F. CONSTABEL et I. K. VASIL éd., Academic Press Inc., Orlando, 1987, p. 97-114.
- [14] G. MARIGO, Y. M. DELORME, U. LÜTTGE et M. BOUDET, *Physiol. Vég.*, 21, 1983, p. 1135-1144.
- [15] M. OREN-SHAMIR, U. PICK et M. AVRON, *Plant. Physiol.*, 93, 1990, p. 403-408.
- [16] Z. S. LI et S. DELROT, *Plant. Physiol.*, 84, 1987, p. 895-899.
- [17] L. REINHOLD, A. SEIDEN et M. VOLOKITA, *Plant. Physiol.*, 75, 1984, p. 846-849.
- [18] D. K. DOUGALL, in *Plant tissue culture as a source of biochemicals*, E. J. STABA éd., C.R.C. Press., Boca Raton, 1980, p. 21-59.
- [19] W. G. W. KURZ et F. CONSTABEL, *Critical Rev. Biotechnol.*, 2, 1985, p. 105-118.

I. H. et R. J. : *Laboratoire de Physiologie végétale appliquée,*  
*Université des Sciences et Techniques du Languedoc,*  
*place Eugène-Bataillon, 34095 Montpellier Cedex;*

I. H. et B. M. : *Laboratoire de Biotechnologie, ORSTOM, 911, avenue Agropolis;*  
*B.P. n° 5045, 34032 Montpellier Cedex 1;*

J.-C. B. : *Laboratoire de Physiologie végétale, Université des Sciences et Techniques du Languedoc,*  
*place Eugène-Bataillon, 34095 Montpellier Cedex.*

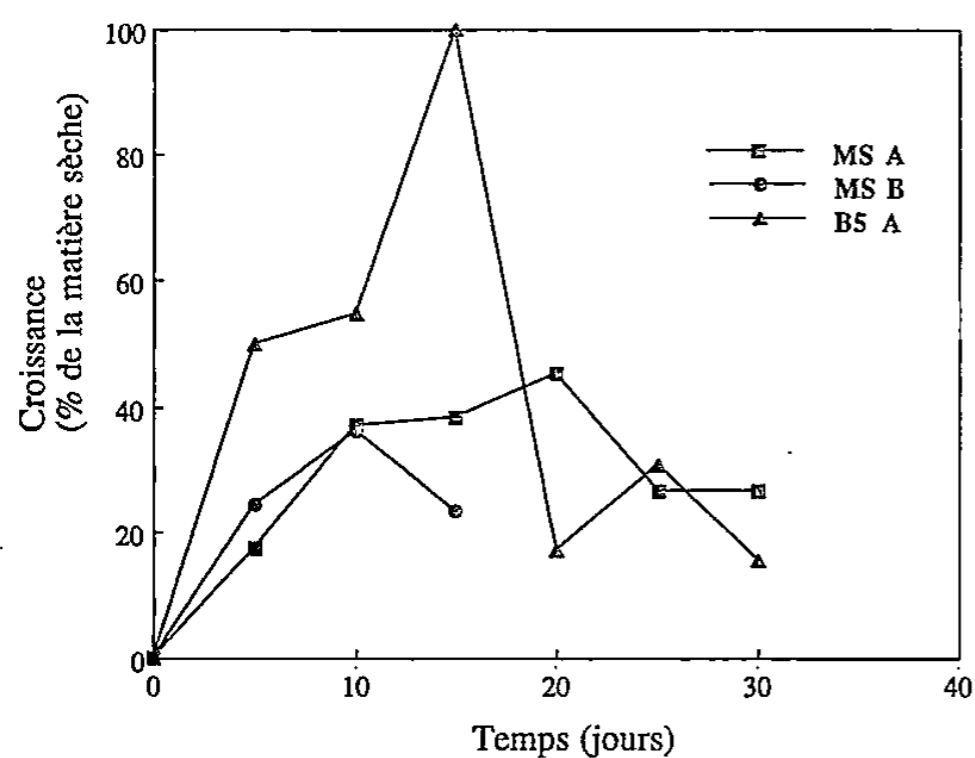


Fig. 1

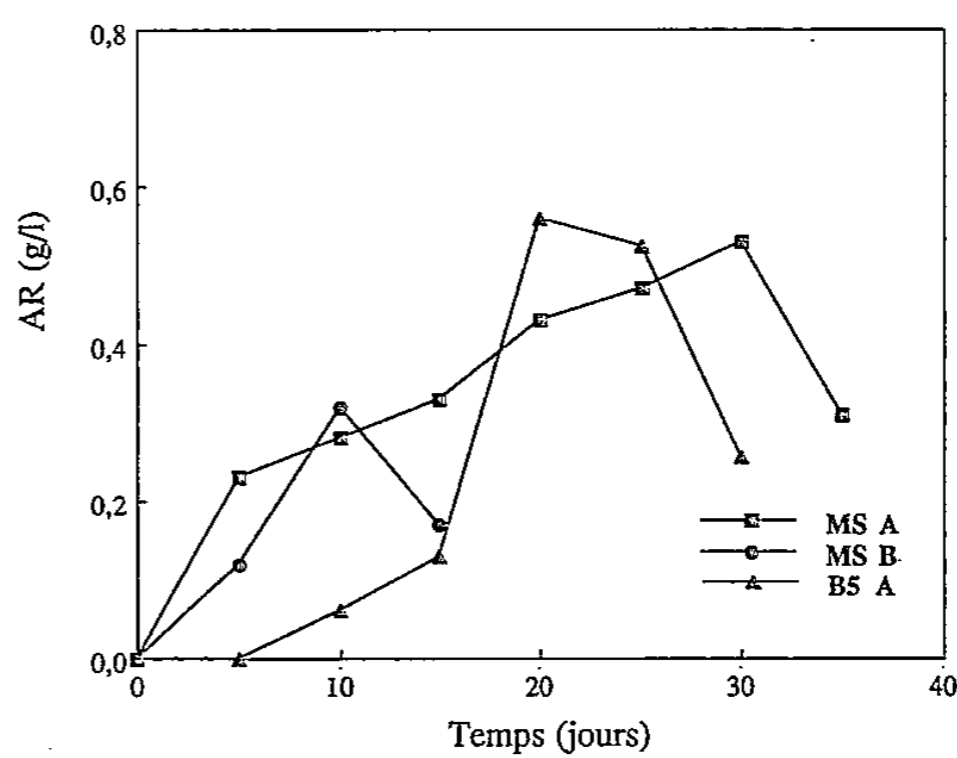


Fig. 2

Fig. 1. — Évolution de la biomasse (pourcentage de matière sèche) des suspensions cellulaires de *Salvia officinalis* sur différents milieux d'entretien contenant du saccharose (88 mM).

Fig. 1. — Time-course of cell growth (per cent of dry matter) of *Salvia officinalis* cell cultures on different routine media containing 88 mM sucrose.

Fig. 2. — Évolution de la production d'acide rosmarinique (AR g.l<sup>-1</sup>) par des suspensions cellulaires de *Salvia officinalis* sur différents milieux d'entretien contenant du saccharose (88 mM).

Fig. 2. — Time-course of rosmarinic acid (AR g.l<sup>-1</sup>) production by *Salvia officinalis* cell cultures on different routine media containing 88 mM sucrose.

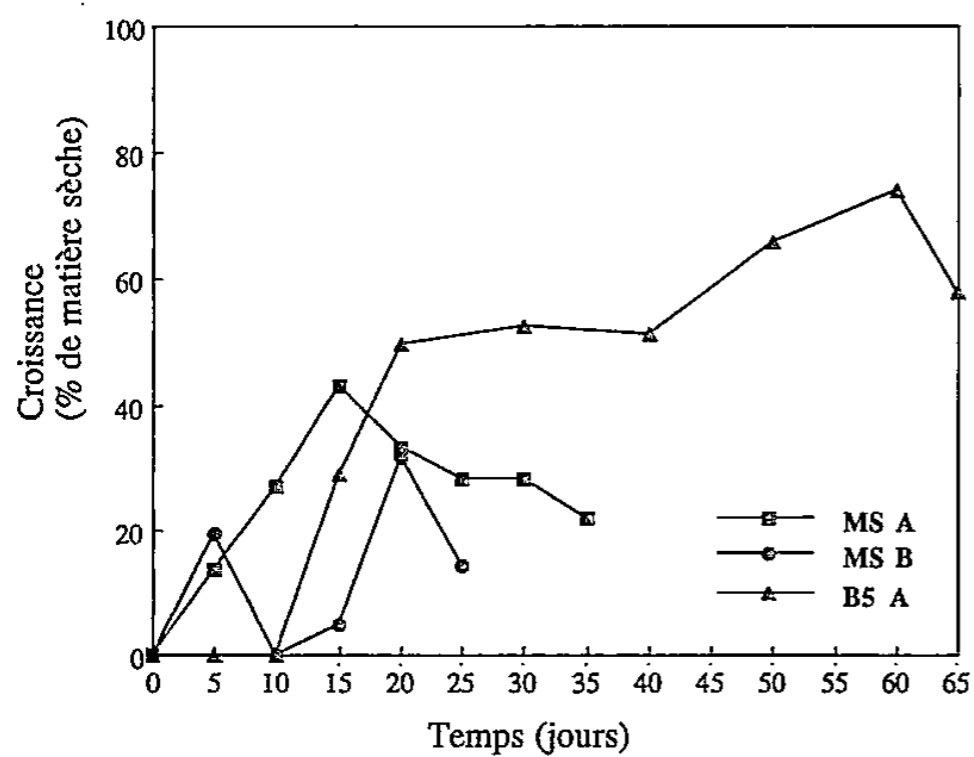


Fig. 3

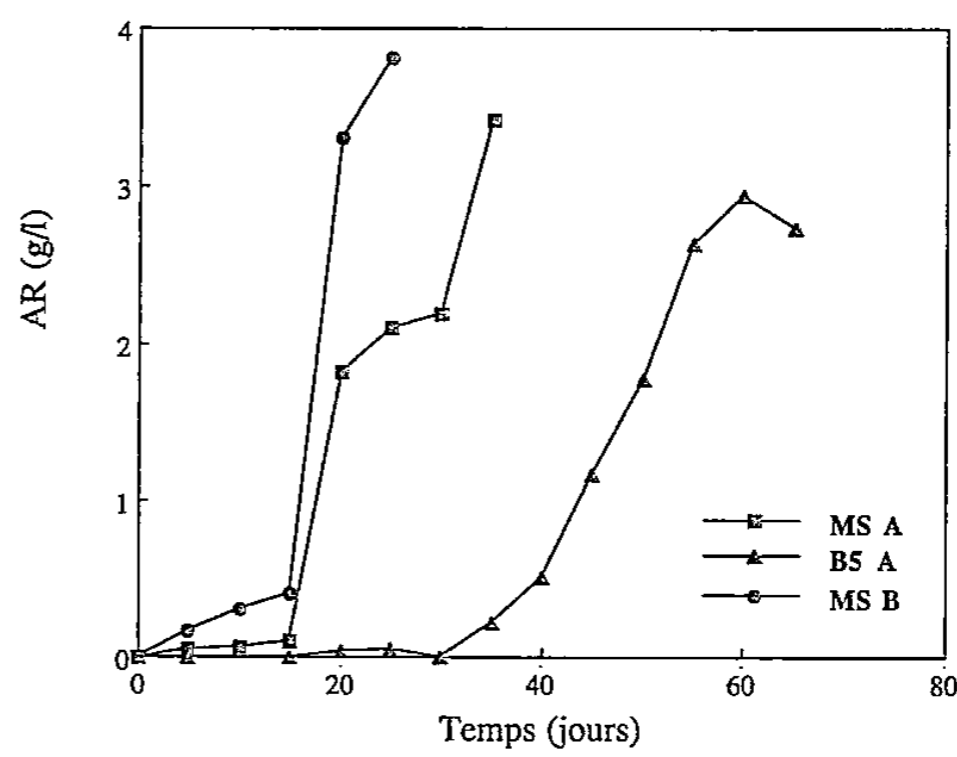


Fig. 4

Fig. 3. — Évolution de la biomasse (pourcentage de matière sèche) des suspensions cellulaires de *Salvia officinalis* sur différents milieux d'entretien contenant une concentration de saccharose plus élevée (0,146 M).

Fig. 3. — Time-course of cell growth (per cent of dry matter) of *Salvia officinalis* cell cultures on different routine media containing 0.146 M sucrose.

Fig. 4. — Évolution de la production d'acide rosmarinique (AR g.l<sup>-1</sup>) par des suspensions cellulaires de *Salvia officinalis* sur différents milieux d'entretien contenant une concentration de saccharose plus élevée (0,146 M).

Fig. 4. — Time-course of rosmarinic acid (AR g.l<sup>-1</sup>) production of *Salvia officinalis* cell cultures on different routine media containing 0.146 M sucrose.





## Résistance à la déshydratation et à la congélation dans l'azote liquide d'apex enrobés de vigne (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay)

Pascale PLESSIS, Claude LEDDET et Jean DEREUDDRE

**Résumé** — Une technique de cryoconservation d'apex de vigne (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay) est proposée. Les apex des bourgeons axillaires de vitroplants sont d'abord enrobés dans des billes d'alginate puis précultivés pendant plusieurs jours dans des milieux progressivement enrichis en saccharose. Les billes d'alginate contenant 1-3 apex sont déshydratées dans un flux d'air stérile, refroidies progressivement ( $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{mn}^{-1}$ ) jusqu'à  $-80^{\circ}\text{C}$  et plongées dans l'azote liquide. Après réchauffement à température ambiante, les apex enrobés sont repiqués sur un milieu contenant du sérum de veau fœtal. Après une préculture progressive jusqu'à 1 M de saccharose, 24 % des apex ayant été refroidis à  $-196^{\circ}\text{C}$  ont redonné des vitroplants.

### Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate-coated shoot-tips of grape vine (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay)

**Abstract** — A specific cryopreservation procedure for axillary shoot-tips of *in vitro* plantlets of grape vine (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay) is proposed. Shoot-tips were first trapped in alginate beads and precultured for several days in media containing increasing concentrations of sucrose. Beads containing 1-3 shoot-tips were then dehydrated in sterile air-flow, gradually cooled ( $0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) to  $-80^{\circ}\text{C}$  and immersed in liquid nitrogen. After thawing in air at room temperature, shoot-tips were subcultured on medium supplemented with bovine fetal serum. Plantlet recovery (up to 24%) depended on the final sucrose concentration in the preculture medium.

**Abridged English Version** — Grape vine is an economically important species which has been considered by the I.B.P.G.R. (International Board for Plant Genetic Resources) [1] for cryopreservation procedures. Micropropagation of *Vitis* was first successfully obtained by Galzy [2], and *in vitro* collections have been established for storage of pathogen-free germplasm. However, grape *in vitro* plantlets are sensitive to temperatures below  $+8^{\circ}\text{C}$  [3]. The procedure established for cryopreservation of pear shoot-tips involving cold-hardening at low temperature could not be applied. The aim of this paper is to describe a technique which could replace cold-hardening by preculture in media with increasing sucrose concentrations.

*In vitro* plantlets of *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay were cultured on modified Murashige and Skoog medium [4] containing  $30\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  sucrose, vitamins and  $6\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  agar (MS medium). Reactivation of axillary shoot-tips was performed on Barlass and Skene medium [5] (BS medium) supplemented with 1% bovine foetal serum (BFS) [6]. Cuttings and shoot-tips were maintained in a culture chamber where the temperature was  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  and the photoperiod  $16\text{ hrs}\cdot\text{day}^{-1}$  with  $30\text{ }\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PAR light.

For cryopreservation, axillary shoot-tips comprising two buds (anticipated and latent buds) [7], were excised from 7-week-old plantlets and trapped in alginate beads as described in previous papers ([8], [9]). Encapsulated shoot-tips were precultured in liquid medium supplemented with sucrose. Two preculturing procedures were used. Direct preculture was performed by transferring the beads for 2 days to culture medium supplemented with sucrose at different concentrations (0.1 to 1.5 M). For progressive preculture, sucrose was added every 2 days to obtain successively 0.3, 0.5 and 0.75 M, and then every day for further increases in concentration (1, 1.25, and 1.5 M, successively).

Note présentée par Roger GAUTHERET.

After preculturing, coated shoot-tips were dried under sterile air flow at ambient temperature and humidity for 0 to 5 hrs. The moisture content of beads was expressed as a percentage of fresh weight, and it was determined after desiccation at +102°C.

After dehydration, the beads were transferred into cryobiological vials for freezing. Two freezing procedures were used: rapid freezing, by direct transfer of vials into liquid nitrogen, and two-step freezing. In two-step freezing, samples were progressively cooled ( $0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) from +20 to  $-80^{\circ}\text{C}$  before immersion in liquid nitrogen [10].

After slow rewarming in air, beads containing shoot-tips were transferred on solid BS medium containing 0.3 M sucrose and 1% BFS, in Petri dishes, for 7 days. After extraction from the beads, shoot-tips were transferred on solid new BS medium (0.1 M sucrose and 1% BFS). The results were expressed as a percentage of surviving shoot-tips (apex remaining partially green, two weeks after rewarming), and percentage recovery (percentage of apices giving new plantlets 3 weeks later).

*Resistance to preculture* (Pl. I, Fig. 1). — Survival of shoot-tips to direct preculture decreased to less than 16% when the sucrose concentration was higher than 0.75 M. In contrast, percentage survival remained high (>72%) whatever the final concentration of sucrose, if sucrose was added progressively.

*Resistance to dehydration* (Pl. I, Figs. 2-3). — The resistance of shoot-tips to dehydration depended also on the preculture (Pl. I, Fig. 2). After direct preculture with 0.75 M sucrose and 4 hrs.-dehydration (25% residual water), survival rate was lower than 17%. After 6 days of progressive preculture to the same sucrose concentration, the survival rate after similar dehydration remained higher than 75%. Shoot-tip recovery was not altered by a further increase in sucrose content in the preculture medium from 0.75 to 1.5 M (Pl. I, Fig. 3).

*Resistance to liquid nitrogen* (Pl. I, Fig. 4). — Resistance of shoot-tips to liquid nitrogen was tested only after progressive preculture (0.3 to 1.5 M) and 4 hrs.-dehydration ( $20 \pm 5\%$  residual water). Two-step freezing yielded better results than rapid cooling. Best survival was obtained after preculture with sucrose 0.75, 1 and 1.25 M (respectively 19.5, 24.7 and 18.6%) with an optimum of 1 M.

*Plantlet recovery after freezing in liquid nitrogen* (Pl. II, 1-5). — After freezing in liquid nitrogen, shoot-tips which resumed growth turned green during the second week after rewarming (Pl. II, 1-2), and plantlet recovery occurred during the 2 following weeks. Plantlet recovery from cryopreserved shoot-tips was drastically improved by the addition of 1% BFS to the BS medium. Regrowth occurred by the differentiation of new primordial leaves (Pl. II, 3), and the formation of new axillary buds. Subculture of explants on MS medium lead to the formation of plantlets (Pl. II, 4-5) which can be micropropagated. Application of this process gave a recovery rate very close to the survival rate.

*In conclusion*, regrowth of alginate-coated *Vitis* shoot-tips after dehydration and freezing in liquid nitrogen required progressive preculture in media containing increasing concentrations of sucrose, a two-step freezing procedure, and a special medium for reactivation. Progressive increase in sucrose concentration was first used in association with low temperatures for cryopreservation of *Panax ginseng* cell suspensions [11]. Prolonged preculture in media enriched with sucrose may be an alternative to cold-hardening at low temperatures ([8], [9]); it should be applied to species which are sensitive to low temperatures.

Low survival following cooling in liquid nitrogen may be related to physiological differences caused by the position of shoot-tips along the stem axis and correlative inhibition induced by apical dominance [12].

Complementary research is needed to increase the proportion of shoot-tips which resume growth after cooling in liquid nitrogen.

---

INTRODUCTION. — L'importance économique de la vigne justifie l'étendue des recherches qui lui sont consacrées. Elle est la douzième espèce définie comme prioritaire par l'I.B.P.G.R. (International Board for Plant Genetic Resources) [1].

La technique de microbouturage *in vitro* mise au point par Galzy [2] fut utilisée pendant de nombreuses années en association avec la thermothérapie pour permettre l'élimination des viroses. Par cette technique des collections *in vitro* se sont ajoutées aux conservatoires naturels. Cependant, l'intérêt de ces conservatoires à moyen terme est limité : ils nécessitent une main-d'œuvre importante. De plus, les vitroplants de vigne sont sensibles aux températures basses (inférieures à  $+8^{\circ}\text{C}$ ) [3] et ne peuvent être conservés dans des conditions qui inhibent leur croissance *in vitro*. Les collections ne sont pas à l'abri d'accidents d'ordre climatique ou pathologique et d'erreurs humaines. Ainsi, une congélation des apex dans l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) permettrait d'assurer une conservation à long terme des clones exempts de virus, sans risque important de dérive génétique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Matériel.* — Les vitroplants de vigne (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay) sont multipliés par microboutures sur un milieu MS de Murashige et Skoog [4] modifié, comportant  $30\text{ g.l}^{-1}$  de saccharose, des vitamines et  $6\text{ g.l}^{-1}$  de gélose (DIFCO Bacto Agar). Le pH du milieu est égal à 5,7. Les cultures sont maintenues à  $23^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) avec un éclairage de 16 h ( $30\text{ }\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  PAR). La réactivation des apex est réalisée sur le milieu BS de Barlass et Skene [5] en présence de 1 % de sérum de veau fœtal (BFS) [6].

*Cryoconservation.* — Les apex sont prélevés sur des bourgeons axillaires de vitroplants âgés de 7 semaines. Ils mesurent environ 0,5 mm et comportent généralement le prompt-bourgeon et le bourgeon latent [7].

Après enrobage dans de l'alginate de calcium ([8], [9]), les apex sont précultivés en milieu liquide agité et enrichi en saccharose (0,1 à 1,5 M). La durée de la préculture est de 48 h lorsque les apex sont placés directement dans le milieu final de préculture. Dans le cas d'une préculture progressive le saccharose est ajouté par étapes, toutes les 48 h pour obtenir successivement 0,3, 0,5 puis 0,75 M, puis toutes les 24 h pour atteindre 1, 1,25 et 1,5 M. La préculture progressive dure ainsi de 2 à 9 jours, selon la concentration finale en saccharose.

A l'issue de la préculture, les billes sont déshydratées à température ambiante sous une hotte à flux laminaire. Différentes durées de déshydratation ont été utilisées (de 0 à 5 h). Les billes déshydratées sont placées à sec dans des tubes cryobiologiques en polypropylène puis refroidies rapidement par immersion dans l'azote liquide ou bien en deux étapes après un premier refroidissement progressif ( $0,5^{\circ}\text{C.mn}^{-1}$ ) jusqu'à  $-80^{\circ}\text{C}$ , température inférieure de quelques degrés à la température de vitrification des billes déshydratées [10], avant immersion dans l'azote liquide.

Après 1 h au moins à  $-196^{\circ}\text{C}$ , les échantillons sont réchauffés lentement à température ambiante. Les apex enrobés sont alors transférés sur le milieu BS gélosé à 0,3 M de saccharose enrichi en BFS (1 %) pendant 7 jours, puis les apex sont extraits des billes et déposés directement sur le milieu BS (0,1 M de saccharose et 1 % BFS).

La teneur en eau des billes, exprimée par rapport au poids de matière fraîche, est déterminée après dessiccation (48 h à  $+102^{\circ}\text{C}$ ). La résistance des apex est exprimée en pour cent de survie et de reprise des apex.

**RÉSULTATS. — Résistance des apex à la préculture (pl. I, fig. 1).** — Lorsque les apex enrobés sont placés directement en présence de différentes concentrations en saccharose (préculture directe), les apex ne résistent pas au-delà de 0,75 M de saccharose. Au contraire, si la concentration en saccharose dans le milieu de préculture est accrue progressivement, les taux de survie des apex restent supérieurs à 72 %, quelle que soit la concentration en saccharose atteinte (0,3 à 1,5 M).

**Résistance des apex à la déshydratation (pl. I, fig. 2 et 3).** — La résistance des apex à la déshydratation dépend également du mode de préculture. Dans le cas d'une préculture

#### EXPLICATIONS DES PLANCHES

##### Planche I

Fig. 1. — Effet du mode de préculture, direct (⊕) ou progressif (○) sur le taux de survie des apex en fonction de la concentration finale en saccharose dans le milieu de préculture. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance ( $\alpha = 5\%$ ).

Fig. 1. — Changes in survival rate (%) of shoot-tips precultured directly (⊕) or progressively (○) as a function of sucrose concentration in preculture medium. Vertical bars represent the confidence interval ( $\alpha = 5\%$ ).

Fig. 2. — Évolution du taux de survie des apex en fonction de la durée de déshydratation (0 à 5 h) à la suite d'une préculture directe (⊕) ou progressive (○) avec 0,75 M de saccharose. TEM : apex témoin (non enrobé, sans préculture). (■), évolution de la teneur en eau des billes. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance ( $\alpha = 5\%$ ).

Fig. 2. — Changes in survival rate of shoot-tips as a function of dehydration duration (0 to 5 hrs.) after direct (⊕) or progressive (○) preculture with 0.75 M sucrose. TEM: control shoot-tip (no coating, without preculture). (■), water content of beads during dehydration. Vertical bars represent the confidence interval ( $\alpha = 5\%$ ).

Fig. 3. — Évolution du taux de survie des apex soumis à 4 h de déshydratation (▼) en fonction de la concentration finale en saccharose des milieux de préculture (0,3 à 1,5 M) et de la teneur en eau résiduelle des billes (■). (△), témoin de préculture. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance ( $\alpha = 5\%$ ).

Fig. 3. — Changes in survival rate of alginate-coated shoot-tips to 4 hrs.-dehydration (▼) as a function of final concentration of sucrose in preculture medium (0.3 to 1.5 M) and residual water of beads (■). (△), control of preculture. Vertical bars represent the confidence interval ( $\alpha = 5\%$ ).

Fig. 4. — Effets de la concentration finale en saccharose (0,3 à 1,5 M) du milieu de préculture et d'un refroidissement rapide (⊕) ou progressif (○) sur le pourcentage de survie (%) des apex à un refroidissement à la température de l'azote liquide et de la teneur en eau résiduelle des billes (■), après 4 h de déshydratation. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance ( $\alpha = 5\%$ ).

Fig. 4. — Changes in survival rate (%) of 4 hrs.-dehydrated alginate-coated shoot-tips to liquid nitrogen after rapid (⊕) or two-step (○) cooling as a function of final concentration of sucrose in preculture medium and residual water of beads (■). Vertical bars represent the confidence interval ( $\alpha = 5\%$ ).

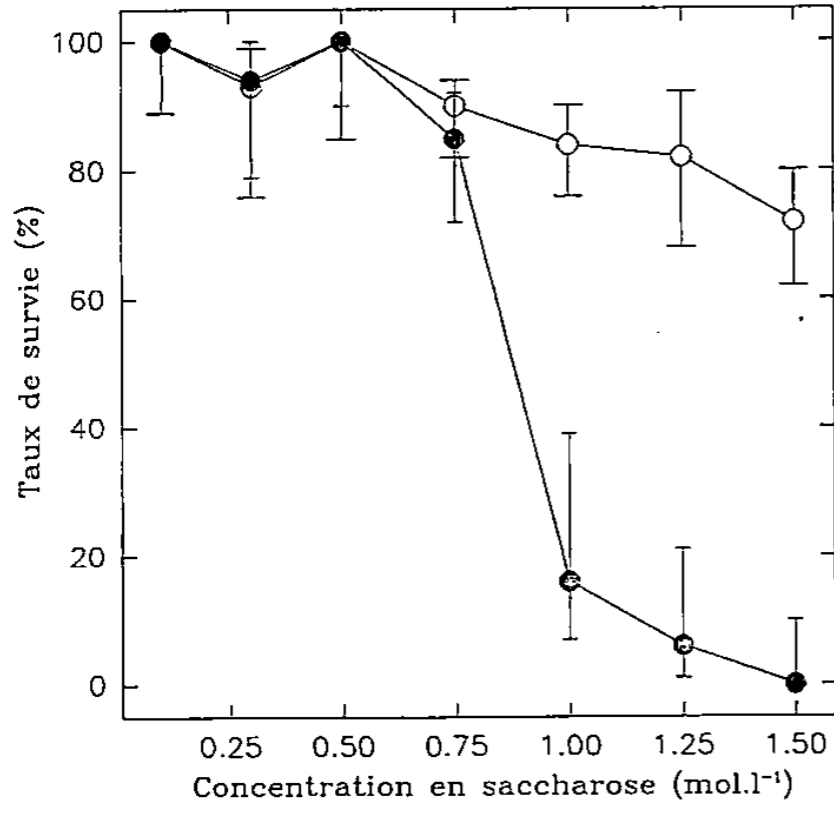


Fig. 1

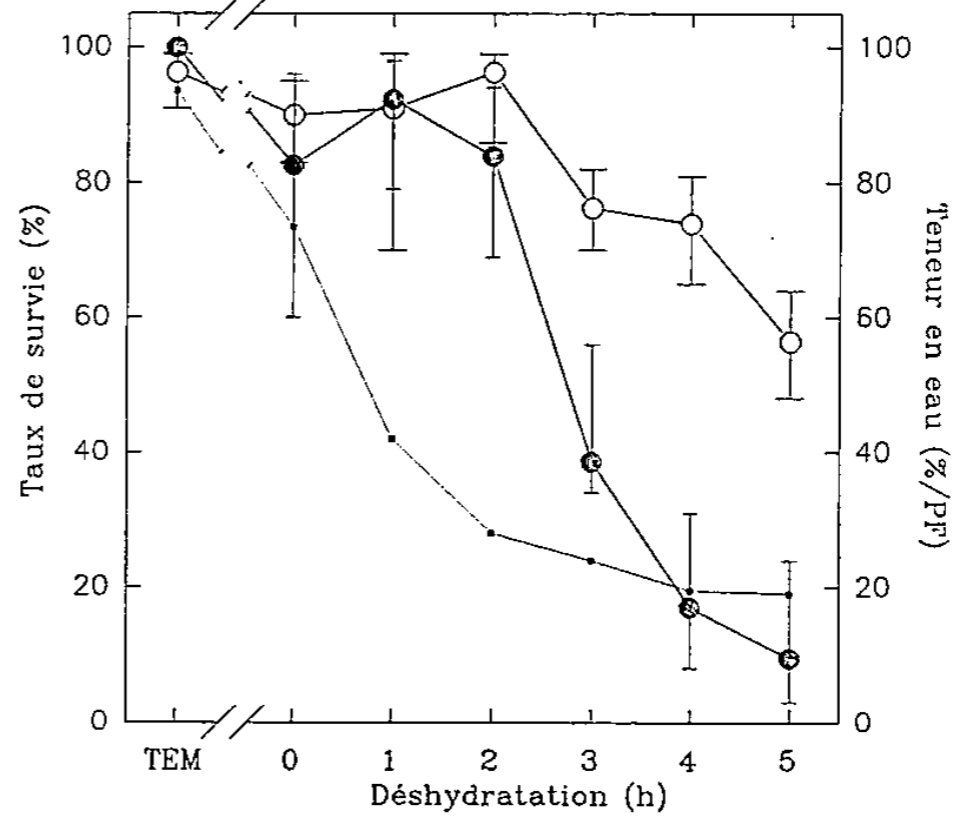


Fig. 2

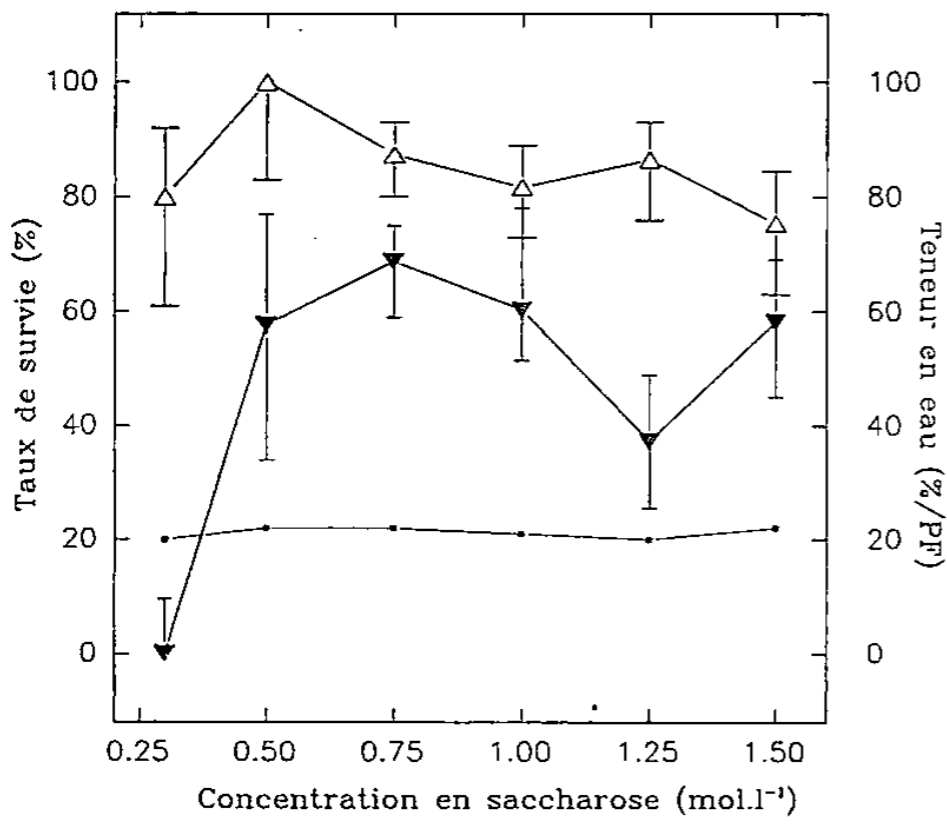


Fig. 3

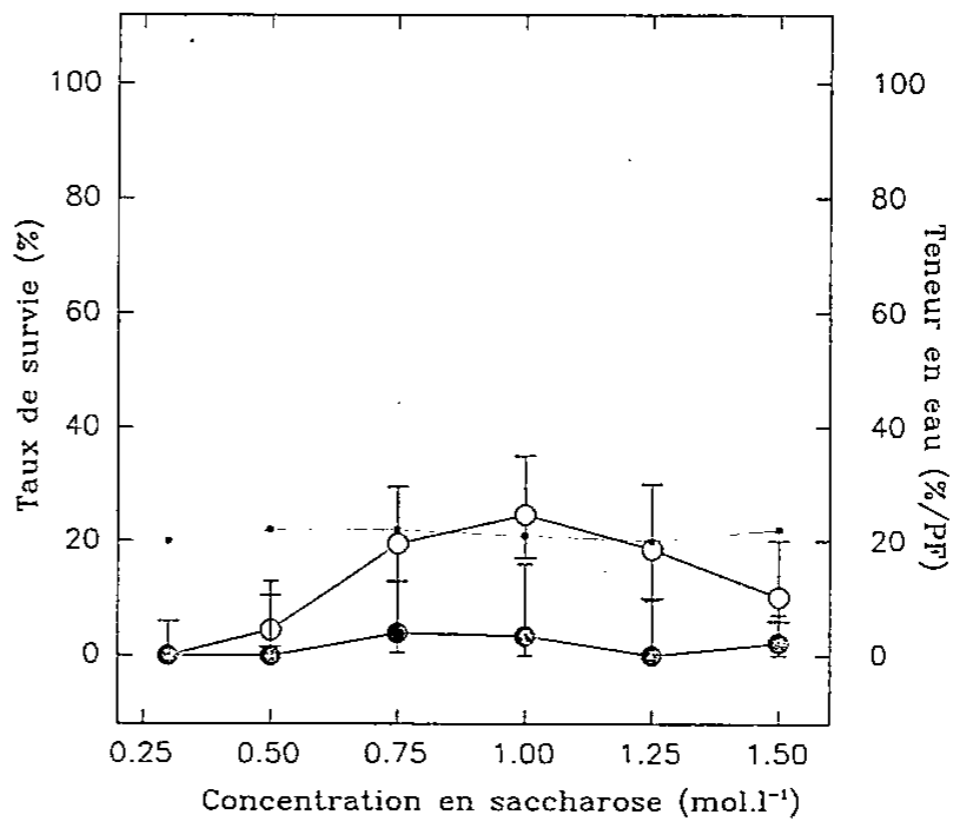
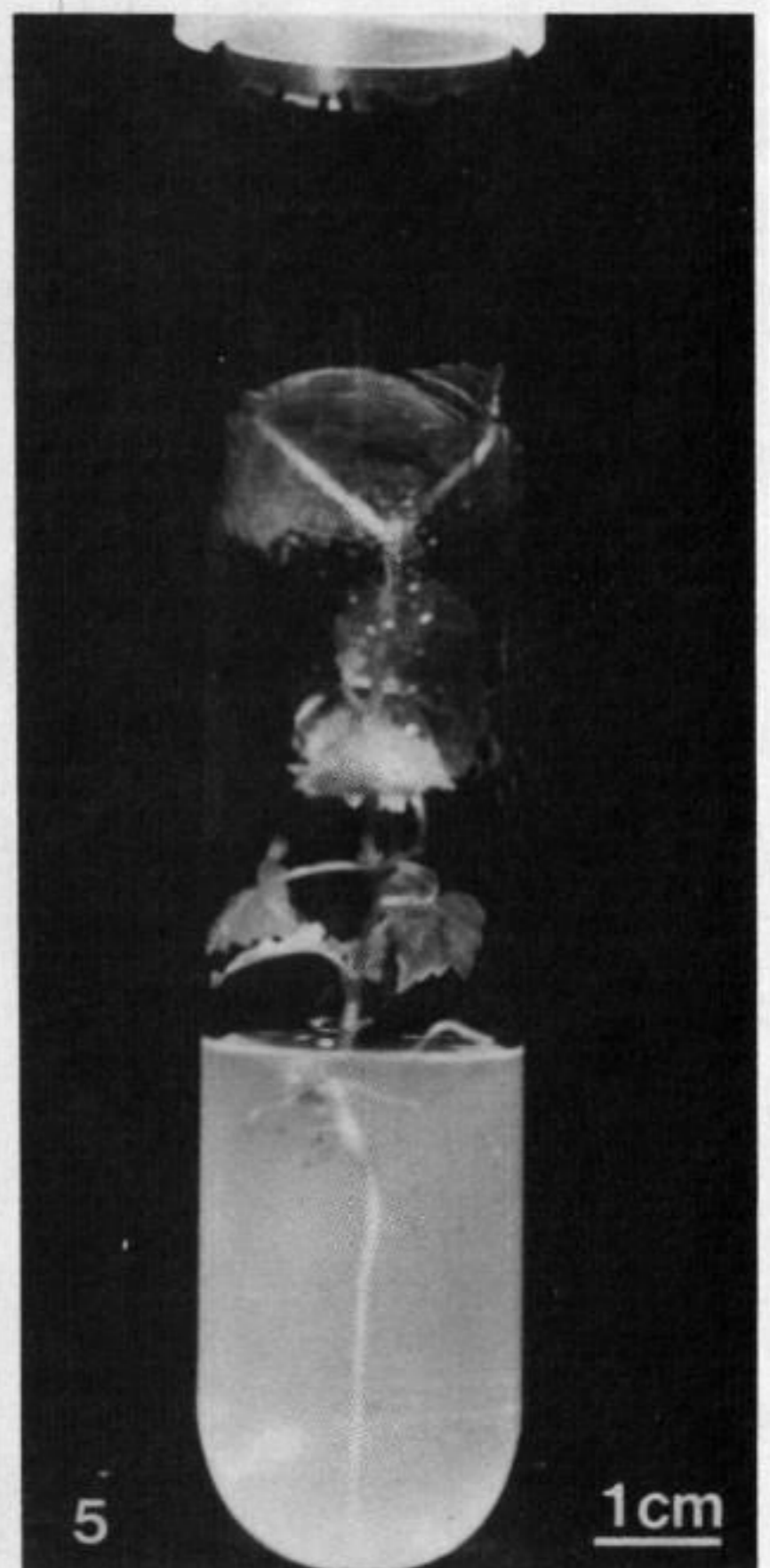
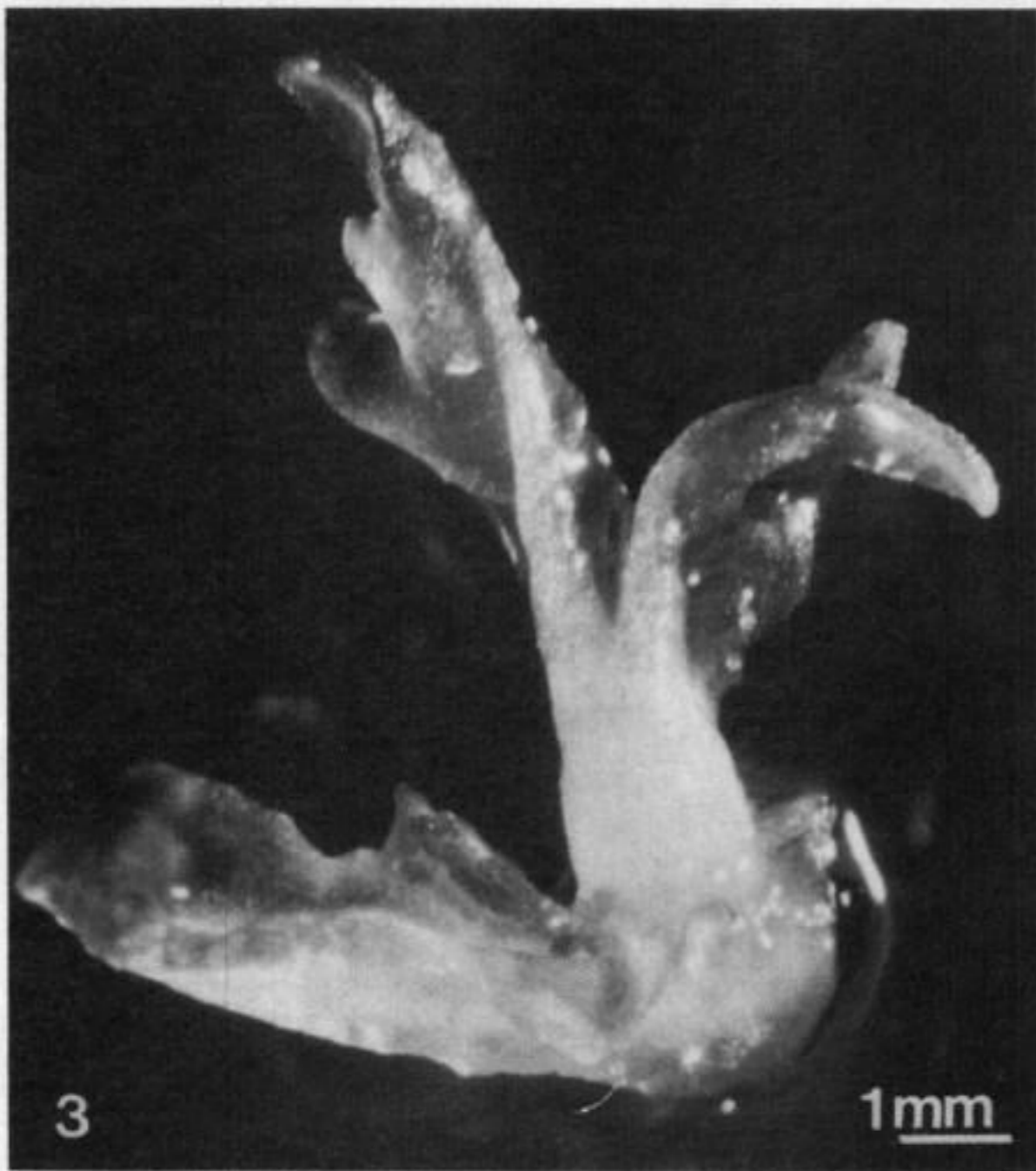
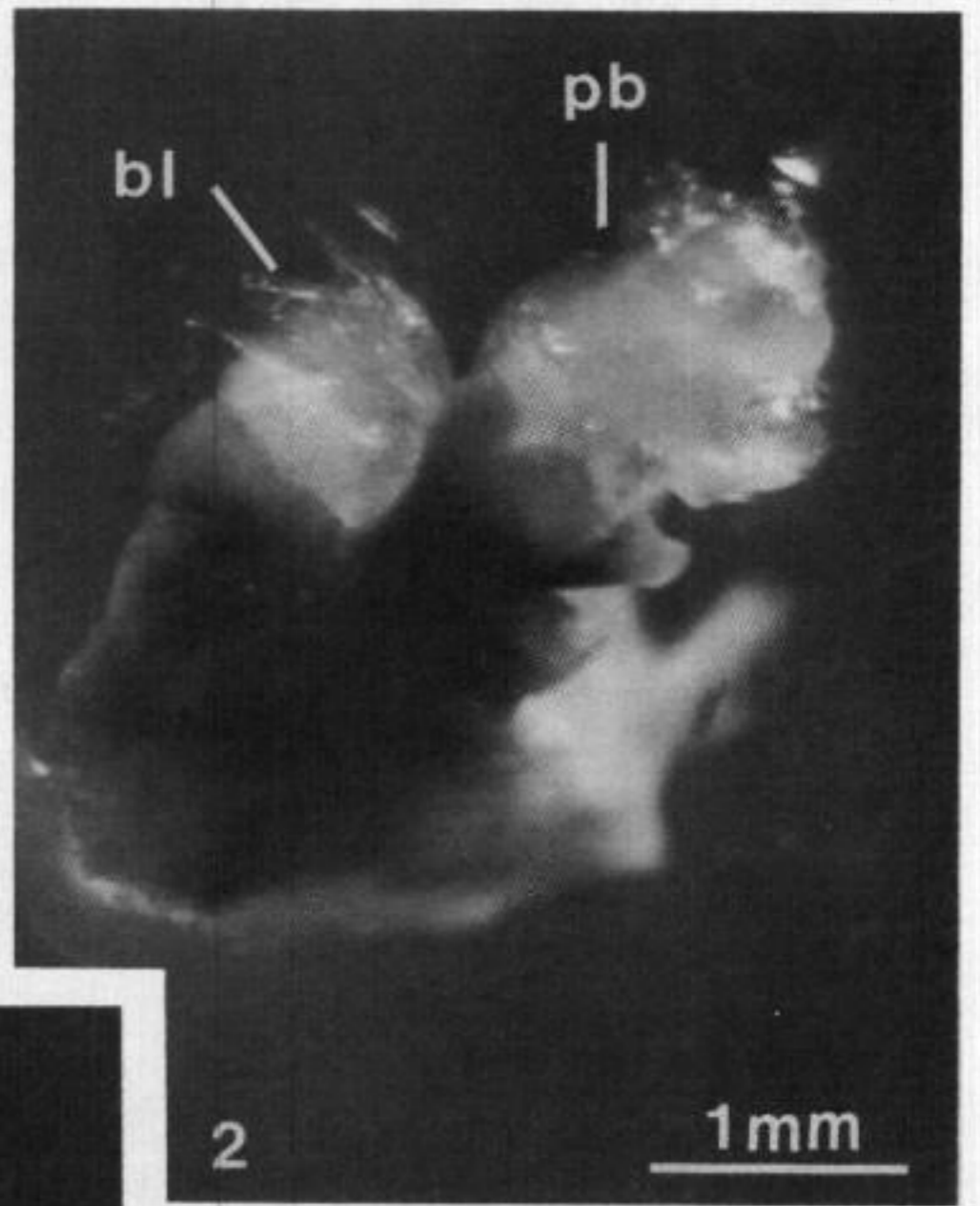
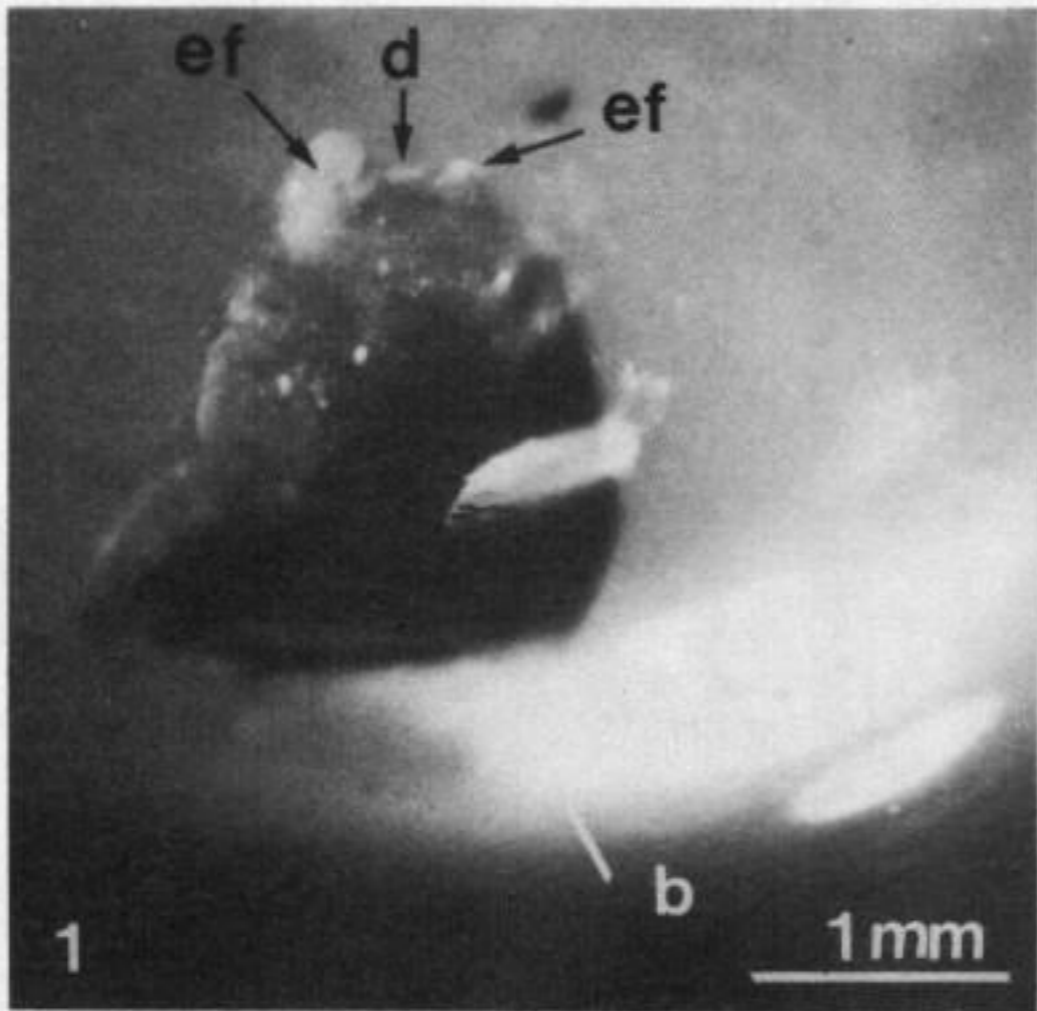


Fig. 4



## Planche II

Développement d'apex de vigne après congélation dans l'azote liquide. 1 : apex enrobé avant extraction de la bille (b) montrant le dome apical (d) et les premières ébauches foliaires (ef). 2 : développement du prompt-bourgeon (pb) et du bourgeon latent (bl) après extraction et repiquage sur le milieu BS. 3 : allongement des ébauches foliaires et formation de l'axe caulinaire. 4 et 5 : formation d'un massif par bourgeonnement axillaire puis développement d'un vitroplant après repiquage sur le milieu MS.

*Development of shoot-tips after freezing in liquid nitrogen. 1: trapped shoot-tips before extraction from beads (b) showing meristematic dome (d) and developing primordial leaves (ef). 2: regrowth of anticipated bud (pb) and latent bud (bl) after extraction and subculture on BS medium. 3: elongation of young leaves and development of the stem axis. 4 and 5: ramification of the stem by the development of axillary buds and obtainment of vitroplant after subculture on MS modified medium.*

directe avec 0,75 M de saccharose (pl. I, fig. 2), le taux de survie est inférieur à 17 % au-delà de 4 h de déshydratation (25 % d'eau). Si la préculture avec 0,75 M de saccharose a été réalisée progressivement, le taux de survie des apex reste supérieur à 75 % dans les mêmes conditions de déshydratation. Il diminue ensuite (55 % après 5 h de déshydratation).

Un comportement similaire (pl. I, fig. 3) a été observé pour des concentrations en saccharose supérieures (1, 1,25 et 1,5 M). Une durée de déshydratation de 4 h a été retenue, elle permet une survie de 75 % des apex pour une teneur en eau résiduelle de 20 % ( $\pm 5$  %), compatible avec une congélation dans l'azote liquide. Au-delà de 4 h de déshydratation, le taux de survie des apex devient trop faible.

*Résistance des apex à la congélation dans l'azote liquide* (pl. I, fig. 4). — Deux modes de refroidissement ont été envisagés; un refroidissement direct par immersion dans l'azote liquide et un refroidissement en deux étapes comportant un prérefroidissement à vitesse contrôlée. Dans les deux cas les apex ont préalablement été précultivés progressivement en présence de saccharose (0,3 à 1,5 M), puis déshydratés pendant 4 h. Les apex résistent mieux à une congélation en deux étapes qu'à une immersion directe dans l'azote liquide. Les apex précultivés jusqu'à 0,75, 1 et 1,25 M ont présenté des taux de survie similaires de 19,5, 24,7 et 18,6 % respectivement. Pour une concentration finale de saccharose moins importante (0,5 M) ou plus élevée (1,5 M) les taux de survie sont faibles (respectivement 4,4 et 10,5 %) et non significativement différents de ceux obtenus lors d'une congélation directe (comparaison des fréquences  $\alpha = 5$  %, test *t*).

*Reprise des apex après congélation dans l'azote liquide* (pl. II, 1-5). — Après congélation dans l'azote liquide, la survie des apex se manifeste 1 semaine après le réchauffement par un reverdissement des parties méristématiques (pl. II, 1-2). Les tissus de la base de l'apex se sont nécrosés après l'étape de déshydratation. La reprise ultérieure des apex survivants intervient dans le mois qui suit l'extraction de l'apex hors de la bille.

Dans les expériences préliminaires, les apex survivants étaient placés sur les milieux BS gélosés contenant successivement 0,3 puis 0,1 M de saccharose. Sur 36 apex survivants, un seul avait redonné un vitroplant. L'addition de BFS (1 %) dans les milieux de réactivation et l'apport régulier de milieu liquide enrichi en BFS (1 %), permet la reprise d'un grand nombre d'apex. La reprise se manifeste par l'apparition des premières feuilles, l'allongement de la tige (pl. II, 3); et la différenciation de bourgeons axillaires dont le développement conduit à la formation d'une structure ramifiée. Ce massif repiqué (entier ou fractionné), sur le milieu bouture redonne des vitroplants (pl. II, 4-5).

De cette façon, les taux de reprise des apex après déshydratation (72 %) et après congélation (25 %) sont presque similaires aux taux de survie (respectivement 68 et 23 %).



DISCUSSION. — La régénération de plantules de vigne (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay) a été obtenue après une congélation des apex dans l'azote liquide. Elle a nécessité un enrobage des apex, une augmentation graduelle de la concentration en saccharose du milieu de préculture, une déshydratation des apex et un refroidissement en deux étapes jusqu'à la température de l'azote liquide.

La reprise du fonctionnement apical puis l'obtention de plantules sont favorisées par l'addition de sérum de veau fœtal dans les milieux de réactivation. Ce composé favorise la reprise du bourgeonnement axillaire et inhibe la formation de composés phénoliques [6].

Pour certaines espèces comme le Poirier, la résistance des apex à l'azote liquide est obtenue après un endurcissement des vitroplants à basse température [8]. Une augmentation graduelle de la concentration en saccharose associée à une baisse de la température permet d'obtenir un endurcissement de suspensions cellulaires de *Panax ginseng* [11] qui résistent ensuite à la congélation dans l'azote liquide. Chez la vigne qui ne tolère pas les basses températures lorsqu'elle est cultivée *in vitro*, l'augmentation progressive de la concentration en sucre dans le milieu de préculture permettrait d'obtenir l'endurcissement. Un prérefroidissement lent jusqu'à  $-80^{\circ}\text{C}$  permet d'améliorer la résistance à une congélation dans l'azote liquide. Cependant, les taux de survie restent faibles (25 %); ils pourraient être dus à l'existence d'un gradient physiologique le long de l'axe feuillé du vitroplant [12].

La technique mise au point pour les apex de vigne pourrait être appliquée aux autres espèces ligneuses sensibles au « chilling », principalement celles originaires des régions chaudes, et qui ne peuvent être endurcies *in vitro*.

Cependant des études complémentaires sont nécessaires afin d'améliorer les taux de survie et de reprise des apex après la congélation.

Note remise le 7 août 1991, acceptée le 21 août 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] L. A. WITHERS, in *The effects of low temperatures on biological systems*, B. W. W. GROUT et G. J. MORRIS éd., 1987, p. 389-409.
- [2] R. GALZY, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 253, 1961, p. 706-708.
- [3] K. G. M. SKENE et M. BARLASS, *Proc. Australian Plant Breeding Conference Adelaide*, 1983, p. 200-201.
- [4] T. MURASHIGE et F. SKOOG, *Physiol. plantarum*, 15, 1962, p. 473-497.
- [5] M. BARLASS et K. G. M. SKENE, *Vitis*, 17, 1978, p. 335-340.
- [6] P. BASS, E. CLOG et B. WALTER, *Acta Hort.*, 227, 1988, p. 485-488.
- [7] A. C. BERNARD et G. MUR, *Ann. Amélior. Plantes*, 29, 1979, p. 311-323.
- [8] J. DEREUDDRE, C. SCOTTEZ, Y. ARNAUD et M. DURON, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 310, série III, 1990, p. 265-272.
- [9] J. FABRE et J. DEREUDDRE, *Cryo-Letters*, 11, 1990, p. 413-426.
- [10] P. PLESSIS, Résistance à la déshydratation et à la congélation dans l'azote liquide d'apex enrobés de vigne (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay), *Mémoire de D.E.A.*, Univ. Paris-VI, 1990, 50 p.
- [11] R. G. BUTENKO, A. S. POPOV, L. A. VOLKOVA, N. D. CHERNYAK et A. M. NOSOV, *Plant. Science Letters*, 33, 1984, p. 285-292.
- [12] J. DEREUDDRE, J. FABRE et C. BASSAGLIA, *Plant cell Reports*, 7, 1988, p. 170-173.

P. P., C. L. et J. D. : Université Paris-VI, 12, rue Cuvier, 75230 Paris Cedex 05  
 et C.N.R.S.-P.O.V.A.R., 4 ter, route des Gardes, 92190 Meudon;  
 P. P. : G.C.E.V.-MUMM Recherche, B.P.n° 186, 51206 Épernay Cedex.

## Obtention par réaction de polymérase en chaîne (PCR) du gène *rbcL* de la Scrophulariacée holoparasite *Lathraea clandestina* L. Comparaison avec *Digitalis purpurea* L. autotrophe et *Melampyrum pratense* L. hémiparasite

Patrick THALOUARN et Serge RENAUDIN

**Résumé** — L'ADN des amyloplastides de *Lathraea clandestina* L., Scrophulariacée holoparasite a été extrait et purifié. En utilisant la technique d'amplification de séquences spécifiques par la réaction de polymérase en chaîne (PCR), de nombreuses copies d'un fragment représentant près des neuf dixièmes de la partie codante du gène *rbcL* ont été obtenues. La même technique a été utilisée avec l'ADN chloroplastique de Tabac et de deux autres Scrophulariacées la Digitale autotrophe et le Mélampyre hémiparasite. La longueur du fragment, synthétisé à partir de deux amorces représentant de courtes séquences identiques chez le Tabac, l'Épinard et le Maïs, s'est révélée être la même chez chacune des espèces étudiées. En digérant ce fragment par les endonucléases BamHI et KpnI, on peut constater que les sites de restriction ont la même localisation dans les quatre cas. Avec l'endonucléase PstI des profils de restriction différents sont obtenus chez Mélampyre et *Lathraea*. Ces résultats confirment donc notre précédente observation quant à la présence du gène *rbcL* dans le génome plastidial de *Lathraea*, plante dépourvue de chlorophylle. Ils montrent en outre que malgré le mode de vie parasite ce gène a conservé plusieurs caractéristiques communes avec ceux des plantes autotrophes comme la Digitale et le Tabac bien que quelques différences apparaissent cependant entre les trois Scrophulariacées étudiées. Une étude de la séquence obtenue par la réaction de polymérase en chaîne permettra de déterminer plus précisément l'importance des variations du gène *rbcL* en fonction du degré d'hétérotrophie de la plante considérée.

### Polymerase chain reaction evidence of the *rbcL* gene in the Scrophulariaceae holoparasite *Lathraea clandestina* L. Comparison with the autotroph *Digitalis purpurea* L. and hemiparasite *Melampyrum pratense* L.

**Abstract** — Amyloplastid DNA was extracted from the Scrophulariaceae holoparasite *Lathraea clandestina* L. and then purified. An *rbcL* gene amplification was performed using polymerase chain reaction. Two regions of well conserved sequences in Tobacco, Spinach and Maize *rbcL* gene have been used as primers. PCR yields a sequence of about 1,230 base pairs, almost nine tenths of the *rbcL* coding region. Identical results were obtained with plastid DNAs from Tobacco and two other species of Scrophulariaceae: the non-parasitic *Digitalis purpurea* L. and the hemiparasite *Melampyrum pratense* L. PCR products were digested with BamHI restriction enzyme and no changes were shown in the localization of the restriction site whatever the species assayed. Identical restriction patterns were also observed with Tobacco and *Digitalis* PCR products restricted with PstI and KpnI, whereas *Melampyrum* and *Lathraea* exhibited a different restriction pattern with PstI. So, despite slight differences, some analogies between *Lathraea* and *Digitalis* or Tobacco gene were evidenced. Cloning and sequencing of these PCR products could give a more accurate response to the following question: to what extent have changes occurred in the *rbcL* gene in a plant which lacks chlorophyll?

**Abridged English Version** — In a previous study, a weak ribulose biphosphate carboxylase (Rubisco) activity was detected in the Scrophulariaceae holoparasite *Lathraea clandestina* L. [1]. Using immunochemical methods, both subunits of Rubisco were detected in an enzymatic extract of the tissues of *Lathraea* [2]. More recently, *rbcL* gene encoding for the large subunit was evidenced in the plastid DNA of this plant which lacks chlorophyll [3]. This was performed using a BamHI fragment of Tobacco plastid DNA as heterologous probe. However, the dot-blot hybridization signals were seen more intensive when plastid DNAs from chlorophyllous plants hybridized with the probe.

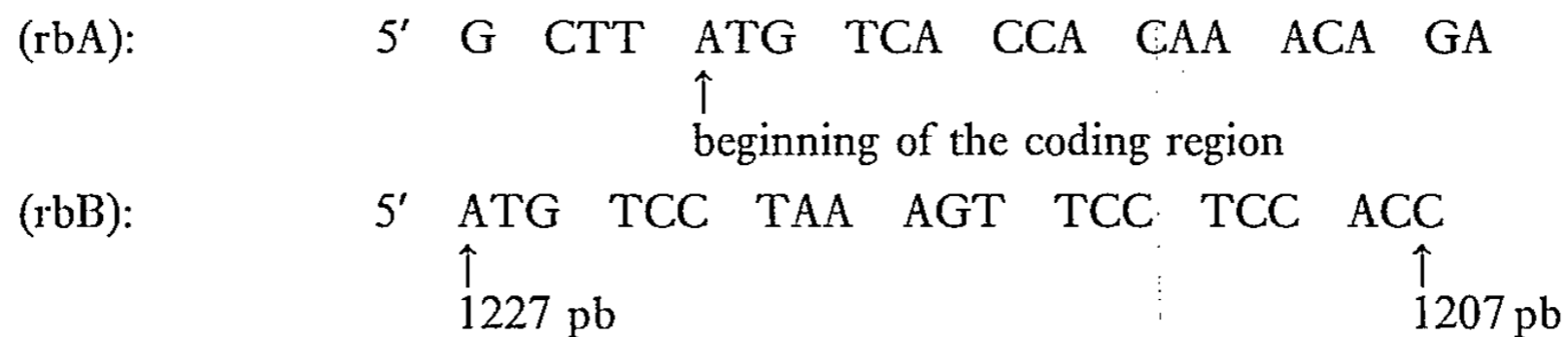
It was recently reported that the plastid genome of *Epifagus virginiana*, an Orobanchaceae holoparasite, has lost most, if not all, of the chloroplast genes for photosynthesis and especially

Note présentée par Serge RENAUDIN.

the *rbcL* gene [4]. So our aim was to give new evidence of the *rbcL* gene in the amyloplast DNA of *Lathraea* and to compare it with the gene of the hemiparasitic *Melampyrum arvense* L. (cow-wheat) and the autotrophic *Digitalis purpurea* L. (fox-glove). This was performed using DNA amplification by polymerase-chain reaction, a technology of recent application in plant molecular biology [5].

**METHODS.** — *Preparation of chloroplast and amyloplast DNAs.* — They were performed as previously described [3].

*Primers design.* — Two regions of well conserved sequences in Tobacco [6], Spinach [7] and Maize [8] *rbcL* gene have been used as primers



Coding and non-coding regions of the *rbcL* gene, various restriction sites [9], and localization of the primers rbA and rbB are shown in Figure 1.

*DNA amplification by PCR.* — The volume of the reaction mixture was 100  $\mu$ l, containing 500 ng of DNA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM tris-HCl pH 8.3, 60  $\mu$ M of each nucleotide, with 1.25 unit Taq DNA polymerase, and 100 pmol of both primers, completed with an oil overlay. DNA amplification was conducted in a thermal cycler (Hybaid, U.K.) according to the following programme: a first denaturation step without Taq DNA polymerase, 94°C for 10 min. Then 35 cycles were performed each including the denaturation step, 94°C for 45 sec.; the annealing step, 47°C for 1 min.; the extension step, 72°C for 3 min. The last cycle was followed by 10 min. at 72°C. Amplification products were visualized on 1.5% agarose gel with ethidium bromide.

*Restriction patterns of amplification products.* — PCR products were digested directly by endonucleases or following separation from gel with Gene Clean (Bio 101). Restriction fragments were visualized on 1.5% agarose gel with ethidium bromide.

**RESULTS.** — *rbcL amplification by PCR* (Fig. 2). — After DNA amplification of the Tobacco and Scrophulariaceae plastid genomes, amplified fragments of about 1,230 base pairs were obtained. Taking primer localizations on the *rbcL* gene into account this result was expected. A Tobacco *rbcL* probe (Fig. 1) hybridizes quite strongly with the amplification products whereas controls remain without coloration (data not shown).

*Digestion of PCR products* (Fig. 3). — Identical results were obtained with Tobacco and *Digitalis* for the three endonucleases used (BamHI, PstI, KpnI) whereas *Melampyrum* and *Lathraea* exhibited a different restriction pattern with PstI.

**DISCUSSION.** — Among the results related above, some points should be underlined:

- no difference was observed between Tobacco and *Digitalis* PCR products, probably because Scrophulariaceae are closely related to Solanaceae.
- In the plastidial genome of *Lathraea*, the *rbcL* gene was shown not to be very different from those of *Digitalis* and Tobacco:
- Two 21 mer sequences of Tobacco gene used as primers hybridize with the gene of *Lathraea*.
- All the PCR products were of the same size.
- Identical localization of BamHI and KpnI restriction sites on the gene were shown.

These findings are in good agreement with the previous demonstration of a Rubisco activity in the tissues of *Lathraea* [1].

The restriction patterns after digestion by PstI were shown to be different but this cannot be linked yet with the parasitism of *Lathraea*. Whatever that may be, it makes a great difference from the extensive changes observed in the plastid genome of *Epifagus*, member of the Orobanchaceae, a family of holoparasitic angiosperms which was derived from the Scrophulariaceae ([10] to [13]).

Cloning and sequencing the amplified rbcL from the three Scrophulariaceae studied could give a more accurate response to the following question: to what extent have changes occurred in a gene encoding for LSU of Rubisco in a plant which lacks chlorophyll?

---

INTRODUCTION. — Après avoir démontré chez une Scrophulariacée holoparasite dépourvue de chlorophylle, *Lathraea clandestina* L., l'existence d'une très faible activité *in vitro* de la ribulose-bisphosphate carboxylase (Rubisco) [1], nous avons mis en évidence une identité antigénique au moins partielle des deux sous-unités de la Rubisco avec celles de l'Épinard [2]. Par la suite, en utilisant une sonde contenant le gène rbcL qui code pour la grande sous unité de la Rubisco (LSU) de Tabac, des hybridations avec l'ADN amyloplastique de *Lathraea* ont pu être réalisées [3]. Des résultats positifs d'hybridation ont aussi été obtenus avec l'ADN chloroplastique de deux autres Scrophulariacées, la Digitale autotrophe et le Mélampyre hémiparasite. Ainsi, il nous a été possible de conclure que le gène rbcL a été observé dans l'ADN plastidal des trois Scrophulariacées étudiées, même chez l'holoparasite. Toutefois ces simples hybridations en dot-blot ne fournissent pas d'indications précises sur le degré de conservation du gène lorsque les végétaux sont affectés par le parasitisme. Cette question n'est pas superflue car nous avons noté que l'hybridation de la sonde avec l'ADN amyloplastique de *Lathraea* est moins intense qu'avec les ADN chloroplastiques des autres plantes [3]. De plus, l'absence du gène rbcL dans le génome de l'Orobanchaceae holoparasite, *Epifagus virginiana* L. incite à vérifier par plusieurs approches sa présence chez *Lathraea* [4].

Aussi, nous avons cherché à apporter de nouvelles preuves de l'existence du gène rbcL dans le génome plastidial de *Lathraea*. Nous avons tenté d'obtenir de nombreuses copies de ce gène, tel qu'il existe chez les plantes étudiées, en utilisant l'amplification de séquences spécifiques par la réaction de polymérase en chaîne (PCR), technique d'application très récente en biologie moléculaire végétale [5]. Ceci dans le but de comparer la longueur totale et les profils de restriction de la séquence amplifiée chez chacune des trois Scrophulariacées étudiées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — 1. *Matériel végétal.* — *Lathraea clandestina* est récoltée dans l'enceinte de la Faculté des Sciences de Nantes. La Digitale et le Mélampyre sont récoltés aux environs de Nantes au mois de juin. La plante de référence, le Tabac est produite dans le jardin botanique de la Faculté.

2. La préparation de fractions plastidiales, l'extraction et la purification de l'ADN plastidial ainsi que la préparation de la sonde rbcL fournie par le Dr Shinozaki (Nagoya University, Japon) ont été décrites dans une publication précédente [3].

4. *Choix des amorces pour l'amplification par PCR.* — Nous avons recherché dans la partie codante du gène rbcL deux régions où les séquences paraissent conservées sans être séparées par une distance supérieure à 1,5 kb, considérée comme la limite supérieure

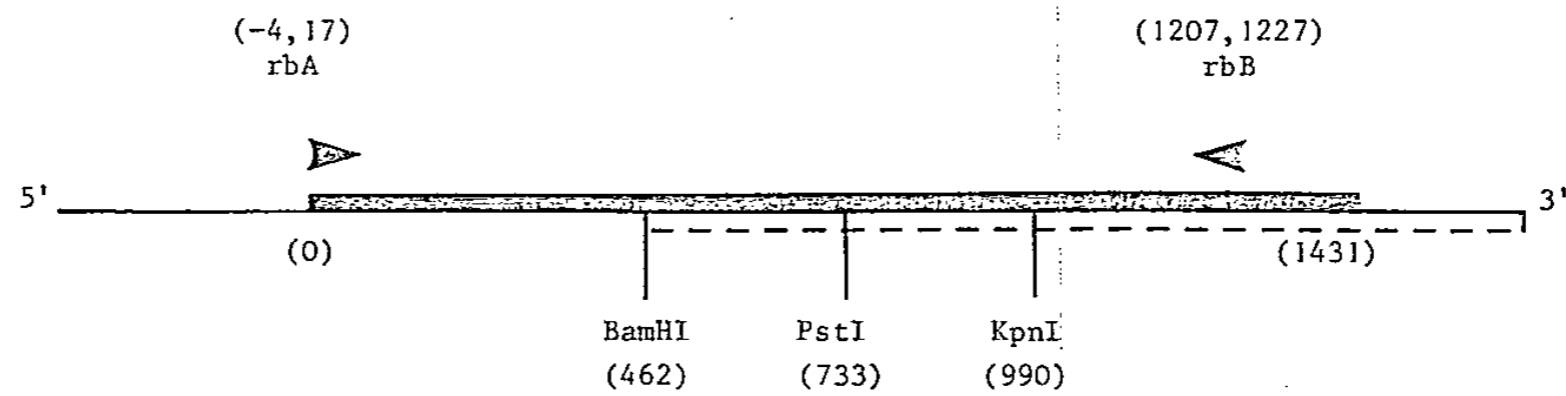
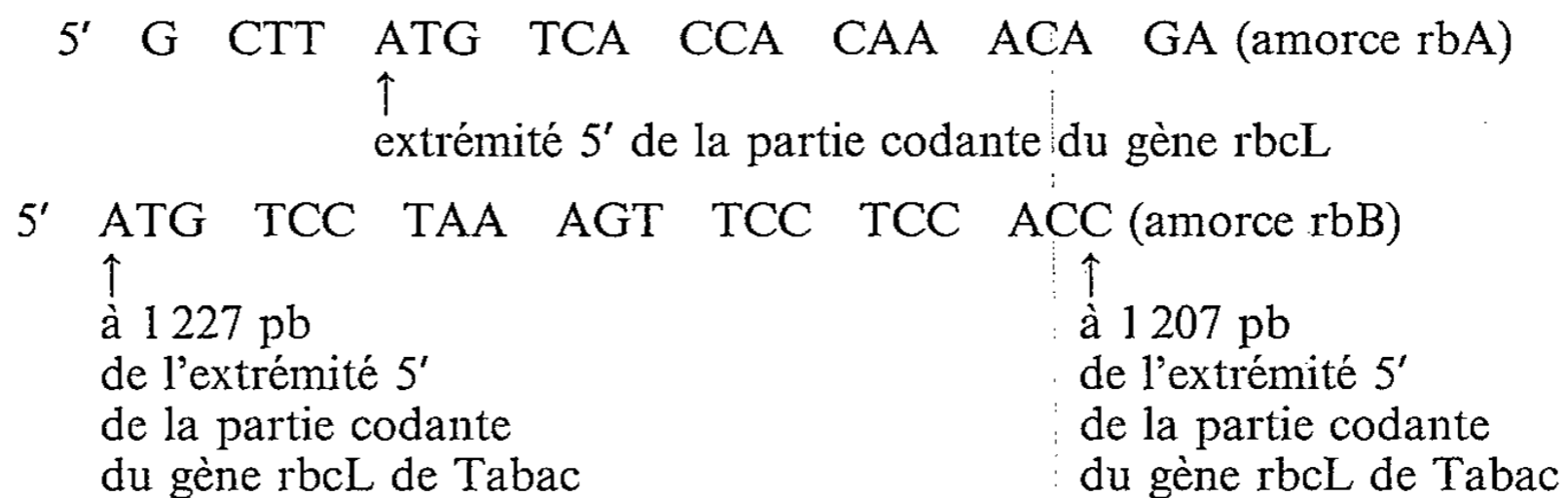


Fig. 1. — Représentation du gène *rbcL* de Tabac. La région codante est en trait épais, les amorces (*rbA* et *rbB*) sont figurées par des flèches. Les chiffres entre parenthèses indiquent la position par rapport à l'extrémité codante en 5'. Le fragment pTBI est représenté par un trait discontinu.

Fig. 1. — Diagram of the *rbcL* gene of Tobacco. The coding region is indicated by a thickened line, primers are marked by horizontal arrows (*rbA* and *rbB*). Numbers in parentheses indicate position in relation to coding end at 5'. pTBI fragment is indicated by a broken line.

pour obtenir des résultats positifs avec l'amplification par PCR. Après étude de la séquence complète du gène chez le Tabac, l'Épinard et le Maïs ([6], [7], [8]) notre choix s'est porté sur les deux séquences suivantes pour les amorces :



Le choix de telles amorces laisse prévoir qu'après amplification par PCR du gène *rbcL* de Tabac de nombreuses copies d'un fragment de 1 231 paires de bases seront obtenues. Le fragment pTBI de Shinozaki et Sugura [6] utilisé comme sonde *rbcL*, les parties codantes et non codantes du gène, les amorces choisies pour la PCR, le fragment amplifié ainsi attendu et les sites de restriction BamHI, PstI et KpnI présents sur la partie codante du gène [9] sont représentés sur la figure 1. Les amorces ont été construites en utilisant un synthétiseur d'oligonucléotides (applied biosystem, 381 A).

5. *Amplification du DNA par PCR.* — Elle s'effectue dans un volume réactionnel de 100 µl contenant environ 500 ng du DNA à amplifier, Mg Cl<sub>2</sub> à 2,5 mM, KCl à 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 à 10 mM, 60 µM de chaque nucléotide, environ 100 pmoles de chacune des deux amorces et 1,25 unités de Taq DNA polymérase (Perkin-Elmer). Un témoin « eau », c'est-à-dire sans ADN, est réalisé. Le tout est recouvert d'une goutte d'huile minérale.

L'amplification est réalisée dans un appareil à température programmée (Hybaid) selon le programme suivant : — 10 mn de dénaturation à 94°C (sans la Taq DNA polymérase) — puis 35 cycles comprenant : 45 s de dénaturation à 94°C, 1 mn d'hybridation à 47°C puis 3 mn de polymérisation à 72°C. Le dernier cycle se poursuit par 10 mn à 72°C.

Les produits de l'amplification sont visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % puis coloration au bromure d'éthidium. Des contrôles ont aussi été effectués grâce à des hybridations en dot-blot de ces produits avec la sonde *rbcL*.

6. *Profils de restriction des produits de la PCR.* — Si nécessaire les produits de l'amplification, visualisés sur gel d'agarose à 1,5 %, sont purifiés en découpant la bande



Fig. 2. — Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % des produits de la PCR : pistes 1 et 6, marqueurs de taille d'ADN :  $\lambda$ /Hind III, pBR 328/Bgl I, pBR 328/Hinf I; pistes 2 à 5, produits PCR de Tabac, Digitale, Mélampyre et *Lathraea*; piste 7, témoin PCR à partir d'ADN mitochondrial de levure; piste 8, témoin PCR sans ADN.

Fig. 2. — PCR products electrophoresed in 1.5% agarose: lanes 1 and 6, DNA molecular weight markers:  $\lambda$ /Hind III, pBR 328/Bgl I, pBR 328/Hinf I; lanes 2-5, PCR products of Tobacco (2), Fox-gloves (3), Cow-wheat (4) and *Lathraea* (5); lane 7, control: PCR of yeast mitochondrial DNA; lane 8, control: PCR without DNA.

de gel correspondant au gène amplifié puis en séparant l'ADN de l'agarose à l'aide du kit GeneClean II (BIO 101).

L'ADN est digéré en petit volume par les endonucléases BamHI, PstI ou KpnI conformément aux prescriptions du fournisseur. Les produits de la digestion sont visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % et coloration au bromure d'éthidium.

RÉSULTATS. — 1. *Comparaison des produits de l'amplification par PCR* (fig. 2). — L'amplification par PCR des ADN plastidiaux du Tabac et des trois Scrophulariacées produit dans chaque cas des fragments d'une taille apparemment identique, de l'ordre de 1 230 paires de bases, conformément à ce qui était attendu, pour le Tabac, compte tenu du choix des deux amorces. L'ensemble pBR 322-insert pTBI ne permet pas d'obtenir un tel produit, ce qui constitue un résultat logique puisque l'insert pTBI, ne contient qu'une seule des deux séquences amorces utilisées (fig. 1). Dans tous les cas où un produit de 1 230 pb a été obtenu, l'hybridation de type dot-blot avec la sonde *rbcl* conduit à une réaction très intense; les témoins sont négatifs (résultat non publié).

2. *Digestion des produits de l'amplification par trois enzymes de restriction* (fig. 3). — Les résultats des trois digestions réalisées sont identiques chez le Tabac et la Digitale. L'hémiparasite Mélampyre présente le même profil de restriction avec BamHI et KpnI, mais son profil avec PstI est différent. Les sites de restriction sur les produits PCR de Mélampyre et de *Lathraea* ont la même localisation.

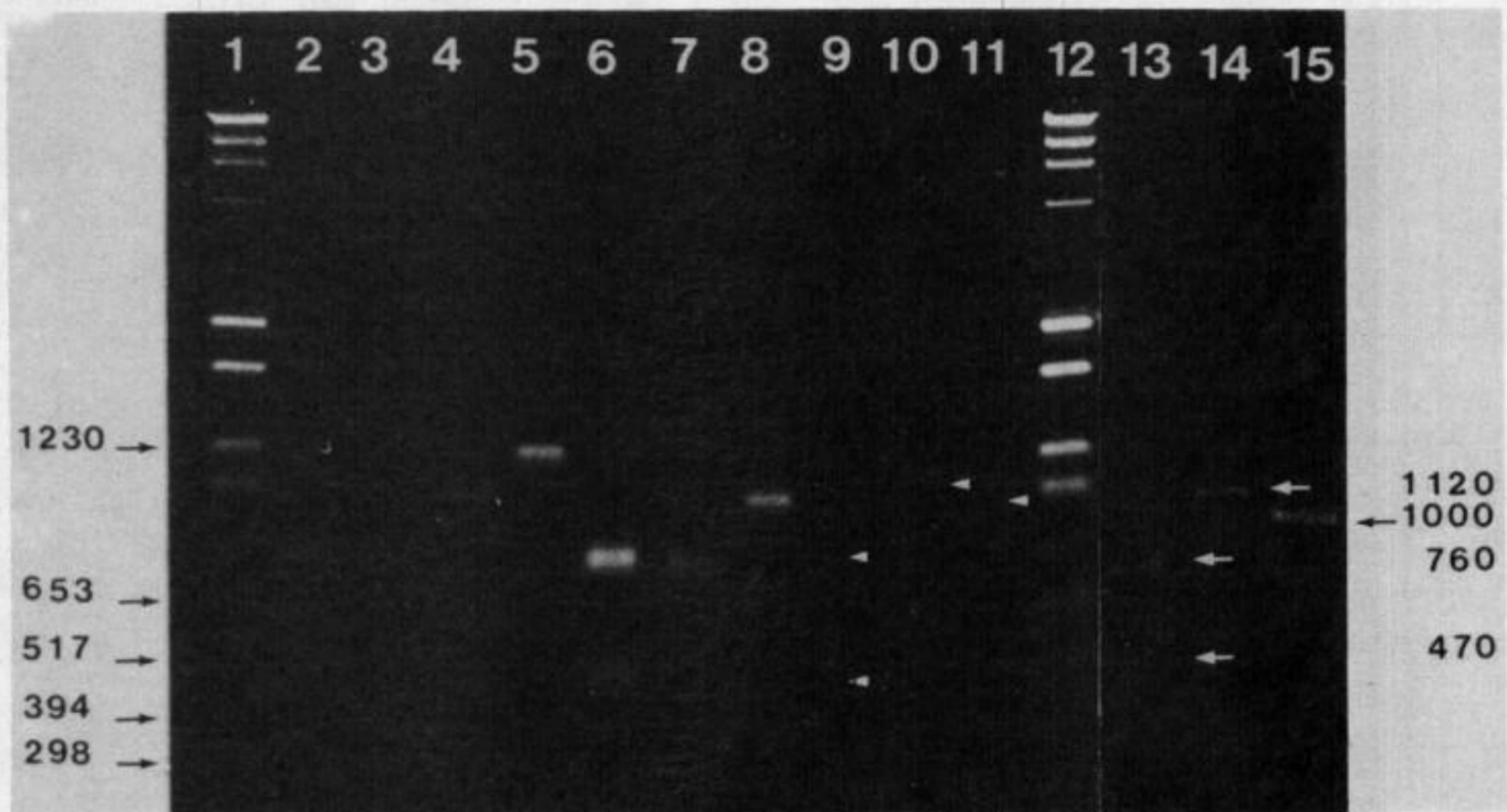


Fig. 3. — Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de la PCR après digestion : pistes 1 et 12, marqueurs de taille d'ADN :  $\lambda$ /Hind III, pBR 328/Bgl I, pBR 328/Hinf I; pistes 2 à 5, produits PCR Tabac digérés par BamHI (2) PstI (3) KpnI (4) non digéré (5); pistes 6 à 8, produits PCR de Digitale digérés par BamHI (6) PstI (7) KpnI (8); pistes 9 à 11, produits PCR de Mélampyre digérés par BamHI (9) PstI (10) KpnI (11) (triangles); pistes 13 à 15, produits PCR de Lathraea digérés par BamHI (13) PstI (14) KpnI (15) (flèches). Les chiffres de droite indiquent la taille des fragments de digestion (en paires de bases); ceux de gauche correspondent aux marqueurs de taille.

Fig. 3. — PCR products digested and electrophoresed in 1.5% agarose: lanes 1 and 12, DNA molecular weight markers:  $\lambda$ /Hind III, pBR 328/Bgl I, pBR 328/Hinf I; lanes 2-5 Tobacco digested with BamHI (2) PstI (3) KpnI (4) non-digested (5); lanes 6-8, Fox-glove products digested with BamHI (6) PstI (7) KpnI (8); lanes 9-11, Cow-wheat digested with BamHI (9) PstI (10) KpnI (11); lanes 13-15, Lathraea digested with BamHI (13) PstI (14) KpnI (15). Numbers on the right indicate molecular weight of digestion fragments (as base pairs); those on the left correspond with DNA molecular weight markers.

DISCUSSION. CONCLUSION. — L'obtention de produits de même taille après amplification par PCR démontre bien l'existence dans le génome plastidial des trois Scrophulariacées étudiées du gène codant pour la grande sous-unité de la Rubisco. Il y a donc une confirmation dépourvue d'ambiguïté des simples hybridations en dot-blot observées entre la sonde hétérologue (fragment pTBI du gène *rbcL* de Tabac) et les ADN plastidiaux de ces trois plantes [3]. C'est notamment le cas pour l'ADN amyloplastique de l'holoparasite *Lathraea* qui présentait avec cette technique une réaction d'hybridation moins intense que celles des ADN chloroplastiques de la Digitale et du Mélampyre.

Les résultats exposés dans la présente Note permettent donc d'ébaucher une comparaison du gène chez ces plantes appartenant à la même famille mais affectées ou non par le parasitisme.

Il faut tout d'abord noter que dans ce travail, encore préliminaire, aucune différence n'a été observée entre le Tabac et la Digitale. C'est d'ailleurs parce que les familles respectives, Solanacées et Scrophulariacées, sont proches du point de vue évolutif que nous avons utilisé le Tabac comme plante témoin. En ce qui concerne *Lathraea*, plusieurs arguments permettent d'affirmer qu'au sein de son génome plastidial le gène *rbcL* a été relativement bien conservé :

— la réalisation d'une hybridation avec les deux amorces formées chacune de 21 nucléotides et correspondant à des séquences bien conservées du gène chez d'autres

végétaux; ce qui indique que ces séquences sont identiques ou peu modifiées chez *Lathraea*.

— l'obtention d'un fragment amplifié de même longueur que ceux fournis par l'amplification des gènes de Tabac et de Digitale, ce qui constitue une nouvelle analogie.

— la conservation au même endroit que sur le gène *rbcL* de Tabac de certains sites de restriction tel le site BamHI et le site KpnI (fig. 1), puisque la digestion par BamHI a donné deux fragments d'environ 770 et 460 pb alors que par KpnI les fragments obtenus sont longs d'environ 1 000 et 240 pb.

Les analogies soulignées avec les autres plantes considérées suggèrent que le gène *rbcL* non seulement s'est maintenu au sein du génome de *Lathraea* mais aussi qu'il y a été assez bien conservé ce qui s'accorde d'ailleurs avec la mise en évidence d'une activité Rubisco, certes très faible [1]. Toutefois, sur les gènes *rbcL* de Mélampyre et de *Lathraea*, le site de restriction PstI est différent, ce qui suggère que la séquence d'environ 1 230 paires de bases a subi quelques modifications. Mais les observations réalisées sont encore trop fragmentaires pour affirmer que ces modifications sont à mettre en relation avec le mode de vie parasitaire.

Chez d'autres plantes parasites, la présence du gène *rbcL* dans l'ADN total de deux Cuscutes dont l'une contient très peu de chlorophylle a été récemment démontrée [10]. Mais chez une véritable holoparasite, l'Orobanchacée *Epifagus virginiana*, dépourvue de chlorophylle comme l'est aussi *Lathraea*, il a été démontré que le gène *rbcL* a disparu d'un génome plastidial lui-même très réduit par rapport aux autres exemples connus ([4], [11], [12]). Si d'un point de vue évolutif, les deux familles respectives, Orobanchacées et Scrophulariacées sont considérées comme très proches, il faut noter que la première ne regroupe que des plantes holoparasites [13]. Cela pourrait s'expliquer par une évolution plus ancienne ou plus marquée vers le parasitisme pouvant alors s'accompagner d'une forte détérioration de son ADN plastidial.

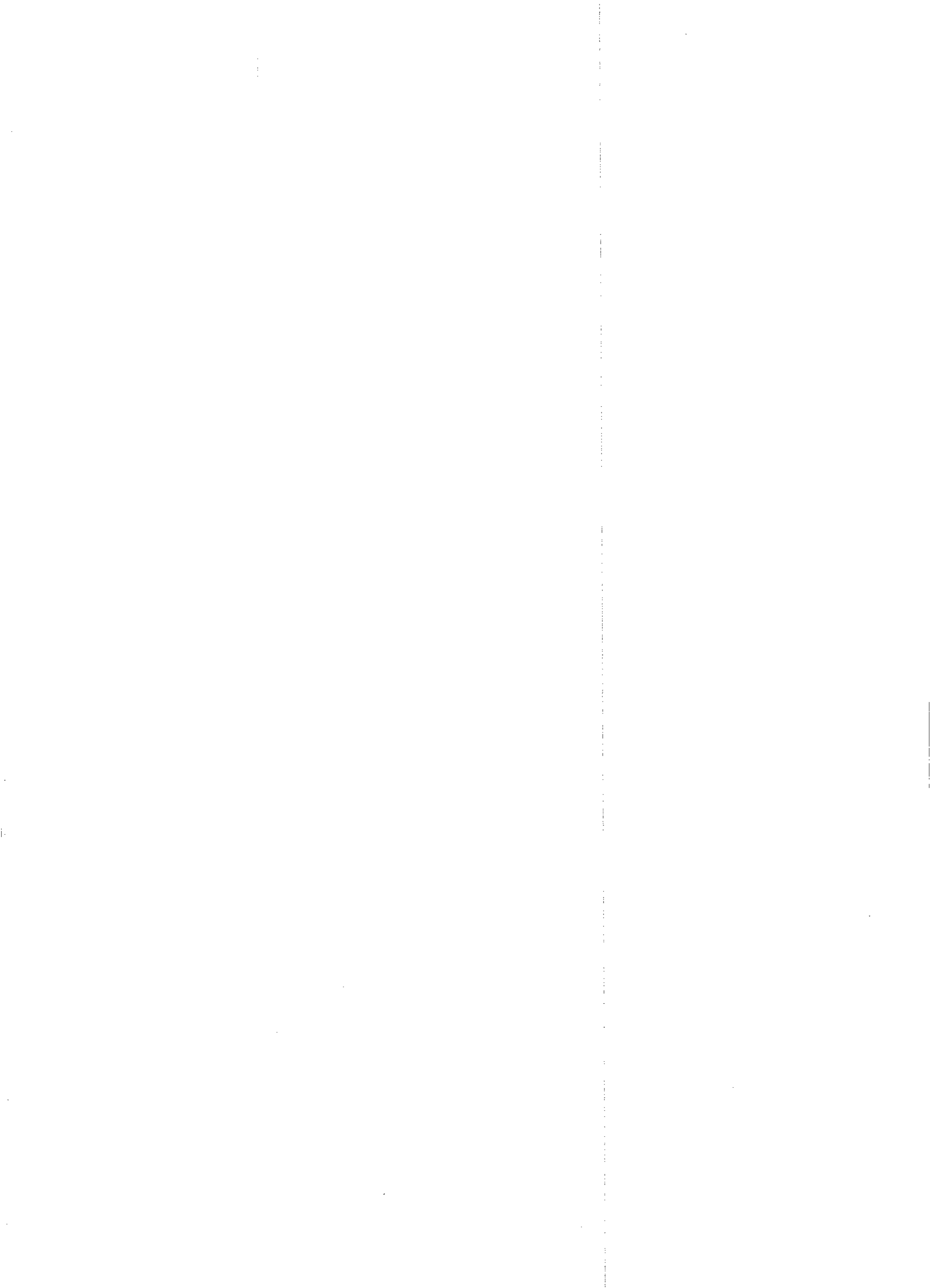
*Lathraea* constitue donc un cas intéressant, celui d'une plante dont le génome plastidial pourrait ne pas avoir été dégradé par le mode de vie holoparasite. C'est pourquoi il convient d'en étudier plus attentivement la structure et l'expression. Mais avant tout, et cela grâce aux produits PCR obtenus, nous nous proposons de comparer plus précisément la séquence du gène *rbcL* chez les trois Scrophulariacées, autotrophe, hémiparasite et holoparasite, que nous avons choisies comme exemples.

Note remise le 15 juillet 1991, acceptée après révision le 19 septembre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. H. BRICAUD, P. THALOUARN et S. RENAUDIN, *J. Plant Physiol.*, 125, 1986, p. 367-370.
- [2] P. THALOUARN, M.-C. ARNAUD et S. RENAUDIN, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 309, série III, 1989, p. 275-280.
- [3] P. THALOUARN, C. THEODET et S. RENAUDIN, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 312, série III, 1991, p. 1-6.
- [4] C. W. DE PAMPHILIS et J. D. PALMER, *Nature*, 348, 1990, p. 337-339.
- [5] J. BOUSQUET, L. SIMON et M. LALONDE, *Can. J. For. Res.*, 20, 1990, p. 254-257.
- [6] K. SHINOZAKI et M. SUGUIRA, *Gene*, 20, 1982, p. 91-102.
- [7] G. ZURAWSKI, B. PERROT, W. BOTTOMLEY et P. WHITFIELD, *Nucl. Acids Res.*, 9, 1981, p. 3251-3270.
- [8] L. MCINTOSH, C. POULSEN et L. BOGORAD, *Nature*, 288, 1980, p. 556-560.
- [9] C. M. LIN, Z. Q. LIU et S. D. KUNG, *Plant Mol. Biol.*, 6, 1986, p. 81-87.
- [10] M. A. MACHADO et K. ZETSCHKE, *Planta*, 181, 1990, p. 91-96.
- [11] J. GRAY, *Nature*, 322, 1986, p. 501-502.
- [12] J. D. PALMER, *Ann. Rev. Genet.*, 19, 1985, p. 325-354.
- [13] P. OZENDA et M. CAPDEPON, *Rev. Gén. Bot.*, 86, 1979, p. 235-298.





Immunologie/*Immunology*  
(Virologie/*Virology*)

## Une immunisation orale et parentérale avec l'immunosome-VIH induit une sécrétion d'IgA spécifique du VIH-1 dans la salive et la production d'IgA circulants chez la souris et le lapin

Lise THIBODEAU, Céline TREMBLAY et Lise LACHAPELLE

**Résumé** — Le VIH, étant principalement transmis par contacts sexuels, l'induction par un vaccin d'une immunité mucoale par des IgA sécrétoires, peut s'avérer être nécessaire à la protection. Nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle des contacts répétés des muqueuses buccales avec les Immunosomes-VIH pourraient induire une réponse immunitaire locale par la production d'IgA sécrétoires dans la salive et également, si une telle immunisation était capable de sensibiliser le système immunitaire à une réponse systémique précoce suite à une immunisation parentérale avec une faible dose d'antigène. Des IgA spécifiques de la gp 160 du VIH-1 ont été détectés dans la salive de tous les lapins dont les muqueuses buccales avaient été mises en contact avec l'antigène. Des titres très élevés d'anticorps IgA, IgM et IgG ont été détectés dans le sérum des souris et des lapins qui avaient reçu une immunisation orale, aussi tôt qu'une semaine après une immunisation par voie parentérale.

### Oral priming followed by parenteral immunization with HIV-immunosomes induce HIV-1-specific salivary and circulatory IgA in mice and rabbits

**Abstract** — Given the sexual transmission of HIV, the establishment of a genital mucosal immunity through secretory IgA may be necessary to achieve protection. We have investigated if repeated stimulations of oral mucosa with HIV-Immunesomes would lead to the production of secretory IgA in saliva and also, if such an oral immunization could prime the immune system to an early systemic immune response following a parenteral immunisation with a low dose of the antigen. HIV-1 gp 160-specific secretory IgA were detected in the saliva of all rabbits orally immunized with HIV-Immunesomes. As early as one week after the parenteral immunization, high titers of serum IgA, IgM and IgG were detected both in mice and rabbits that had been orally stimulated with the antigen. These antibodies could neutralize HIV infectivity in vitro. Animals that were immunized only parenterally showed a very weak humoral immune response.

**Abridged English Version** — The principal way by which infectious agents gain access to an organism is through mucosal membranes. The principal immunoglobulin isotype produced by plasma cells, and exported in secretions such as saliva, colostrum, genito-urinary and gastro-intestinal secretions, is secretory immunoglobulin A (s-IgA) [1]. A large number of studies have shown a strong correlation between the levels of specific s-IgA and protection from infection by microorganisms that have a tropism for mucosal tissues or use them to gain access to other targets in the host ([2]-[5]).

It is reasonable to think that the presence of HIV-specific s-IgA at the genital and colorectal mucosae could have a protective effect against sexual transmission of the virus. It would thus be highly desirable that in addition to the induction of a humoral and cell-mediated immune responses, an anti-HIV vaccine be able to provide mucosal immunity through its capacity to induce secretory IgA.

In previous studies on the immunogenicity of isolated membrane glycoproteins of three enveloped viruses, alone, or in the form of Immunesomes (an Immunesome is a glycoprotein-coated liposome), we have shown that the presentation of the antigen as a particle is much more immunogenic than equivalent amounts of the protein given alone ([8]-[13]). Parameters

Note présentée par Raymond DAUDEL.

such as antigen presentation and route of immunisation play a determining role in the induction of a systemic immune response and mucosal immunity [14].

The objective of this study was to determine if repeated stimulation of oral mucosa with HIV-Immunesomes (HIV-IMS) would lead to the differentiation of resident B-lymphocytes into IgA plasma cells that produce s-IgA specific to the antigen. The second objective was to verify if this type of immunization could prime the immune system for a systemic antibody production following a parenteral administration of a sub-immunizing dose of the antigen.

Oral mucosae of two groups of 10 mice were stimulated with HIV-IMS by introducing 100  $\mu$ l of the antigen (100  $\mu$ g/ml) into the mouth of the animals, one drop at a time. This was repeated 6 times over a 3-week period. Saliva samples were collected 2 days following the last oral immunization by a wash of the oral cavity with 100  $\mu$ l of phosphate buffered saline (PBS). Three weeks later, mice were given 10  $\mu$ g of HIV-IMS by the intraperitoneal and intramuscular routes. Another group of 10 mice were immunized only parenterally with the same amount of HIV-IMS. A serum sample from each mouse was collected one week later. Saliva and serum IgA levels were titrated by an enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) in 96-well plates coated with inactivated HIV-1 particle [10].

It was not possible to demonstrate significant titres of salivary IgA in mice because of the difficulty encountered in the collection of their saliva. However, oral immunization was highly efficient in priming the immune system to a vigorous humoral immune response, including IgA, following a low dose of parenterally administered HIV-IMS. As shown in Table I, serum IgA titres vary between 1/800 and 1/6,400, for a mean value of 1/3,000, and IgM plus IgG titres stand between 1/25,000 and 1/819,200. In addition, all these sera could neutralize HIV infectivity at a dilution of 1/80. Animals that were immunized only parenterally did not develop salivary or circulatory IgA, with the exception of one animal that shows serum IgA titre of 1/400. Serum IgM plus IgG titres stand between 1/100 and 1/400. No neutralizing antibody could be detected in this group.

Groups of 6 rabbits were orally immunized using the same technique as the one used for mice, except that 50  $\mu$ g of HIV-IMS was applied on oral mucosa. Saliva samples were collected 2 days after the last oral immunization. IgA titres in saliva were evaluated by ELISA using peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgA. Only animals orally immunized with HIV-IMS demonstrated the presence of HIV-1 gp160-specific s-IgA in saliva, with titres ranging from 1/20 to 1/1,024 (Table II). Rabbits were then immunized intradermally with 20  $\mu$ g of HIV-IMS and serum samples were collected 1 week later. All animals that had been orally immunized developed gp160-specific circulatory IgA, the titres of which vary between 1/80 and 1/5,120. Serum IgG titres range from 1/160 to 1/20,480 (Table III). All these sera could neutralize HIV infectivity at a dilution of 1/40. As it shown in Table III, rabbits parenterally immunized without previous oral stimulation did not develop salivary or serum IgA and the IgG titres range between 1/40 and 1/160. These sera showed no neutralizing activity.

We have tested the hypothesis according to which repeated contacts of the oral mucosa with HIV-IMS could induce a local immune response through s-IgA. HIV-1-gp160-specific secretory IgA were detected in the saliva of all rabbits that were orally immunized with HIV-IMS. The high titres of IgG plus IgM that were detected as early as one week after parenteral immunization, in both mice and rabbits, is indicative that the oral immunization had primed the animals to an early response to a second encounter with the antigen. Moreover, serum IgA titres were very high in both experimental animals, if one considers that lower levels of IgA relative to IgG or IgM are produced in response to antigen

stimulation [1]. It is important to note that non-replicating antigens do not generally induce circulatory IgA [15]: long-life antigen are required for the induction of serum IgA response [16]. That the *in vivo* half-life of Immunosomes is longer than that of the isolated protein is supported by previous observations in which neutralizing antibodies were still sharply rising 30 days after the last of a 2-injection immunization with rabies-Immunosomes [13].

The fact that s-IgA could be detected only in the saliva of animals that were orally stimulated with the antigen, and not in the saliva of those parenterally immunized, suggests that, in order to achieve mucosal immunity, a formulation suitable for topical application to mucosa should also be developed for the HIV vaccine. Immunosomes appear to be efficient both in parenteral administration and local application.

---

INTRODUCTION. — La principale voie d'infection utilisée par la majorité des microorganismes est constituée par les membranes muqueuses. Cette observation souligne l'importance de la barrière immunitaire qui existe à ce niveau [1]. L'isotype principal produit par les plasmocytes, et transporté dans les sécrétions séro-muqueuses telles que la salive, le colostrum, le lait, les sécrétions trachéo-bronchiques, génito-urinaires et gastro-intestinales, correspond aux immunoglobulines A sécrétoires (s-IgA) [1]. De nombreuses études démontrent sans équivoque qu'il existe une forte corrélation entre la quantité de s-IgA spécifiques et la protection contre une infection par les microorganismes qui ont un tropisme pour les muqueuses ou qui empruntent cette voie pour avoir accès à d'autres cibles dans l'organisme ([2]-[5]).

Une étude de transmission expérimentale du SIV par voie génitale, effectuée chez le macaque mâle et femelle, suggère qu'une lésion au niveau des muqueuses n'est pas nécessaire pour que le virus soit transmis [6]. Ainsi, il est raisonnable de penser que la présence de s-IgA spécifique du HIV au niveau des muqueuses génitales et colorectales pourrait avoir un effet de protection contre la transmission sexuelle du virus.

Archibald et coll. [7] ont examiné les échantillons de salive de cinq volontaires séronégatifs adultes vaccinés avec la gp 160 du VIH-1, produite par recombinaison génétique du baculovirus, pour vérifier la présence de s-IgA. Un seul échantillon sur cinq possédait des anticorps qui réagissait faiblement avec la gp 160/120 par immuno-empreinte. Les études que nous avons effectuées sur l'immunogénicité de glycoprotéines purifiées de trois virus enveloppés, seules ou présentées sous forme d'Immunosomes, ont montré que la présentation de l'antigène sous la forme d'une particule était beaucoup plus immunogène qu'une quantité équivalente de protéine purifiée seule ([8]-[13]).

Des paramètres tels que la présentation de l'antigène, la voie d'immunisation, la dose et le protocole d'immunisation jouent un rôle déterminant dans l'induction par un vaccin d'une réponse immunitaire systémique et d'une immunité muqueuse par des IgA sécrétoires [14]. Nous avons donc voulu vérifier si des stimulations répétées des muqueuses buccales avec l'Immunosome-VIH, induiraient une différenciation des lymphocytes B, présents dans les couches plus profondes, en plasmocytes d'IgA, qui produiraient des s-IgA spécifiques de l'antigène et qui seraient sécrétées dans la salive. Notre deuxième objectif a été de vérifier si ce type d'immunisation était capable de sensibiliser le système immunitaire à une réponse systémique spécifique de l'antigène, suite à une immunisation parentérale avec une dose sub-immunisante.

TABLEAU I

Réponse humorale à une immunisation orale suivie d'une immunisation parentérale avec l'immunosome-VIH-1 chez la souris.

*Humoral response after oral and parenteral administration of HIV-IMS to mice.*

Souris	Immunisation	Titre des anticorps spécifiques du HIV-1 par ELISA <sup>(a)</sup>		
		IgA	IgG + IgM	TN <sup>(b)</sup>
1 . . . . .	++	1 600	102 400	> 80
2 . . . . .	++	3 200	409 600	> 80
3 . . . . .	++	800	102 400	> 80
4 . . . . .	++	3 200	409 600	> 80
5 . . . . .	++	1 200	25 600	> 80
6 . . . . .	++	3 200	409 600	> 80
7 . . . . .	++	6 400	409 600	> 80
8 . . . . .	++	3 200	409 600	> 80
9 . . . . .	++	6 400	819 200	> 80
10 . . . . .	++	1 600	409 600	> 80
11 . . . . .	+	< 100	< 100	< 10
12 . . . . .	+	< 100	200	< 10
13 . . . . .	+	< 100	400	< 10
14 . . . . .	+	< 100	100	< 10
15 . . . . .	+	< 100	100	< 10
16 . . . . .	+	< 100	200	< 10
17 . . . . .	+	400	200	< 10
18 . . . . .	+	< 100	200	< 10
19 . . . . .	+	< 100	100	< 10
20 . . . . .	+	< 100	100	< 10

<sup>(a)</sup> Les plaques ont été recouvertes de VIH inactivés par la chaleur. Des dilutions par deux de sérums de souris ont été incubées durant 2 h à 37°C et la nuit à 4°C. Les anticorps liés au virus ont été détectés avec un sérum anti-IgA, ou anti-IgM + IgG de souris couplé à la peroxidase. Les titres sont exprimés comme la plus haute dilution donnant une densité optique à 490 nm supérieure à 0.2.

<sup>(b)</sup> TN = *titre neutralisant*. Des dilutions par deux de sérums de souris (25 µl) ont été incubées avec un volume égal du VIH-1 (100 TCID<sub>50</sub>) durant 1 h à 37°C, suivi d'une incubation à 4°C durant la nuit. Les mélanges virus-anticorps ont été ajoutés à 4 × 10<sup>5</sup> cellules CEM, en quatre exemplaires, dans des plateaux 24 puits et incubés à 37°C. L'infectivité du VIH a été évaluée par l'effet cytopathogène, observé quotidiennement, et par immunofluorescence, à l'aide d'un sérum de référence humain positif pour les antigènes HIV-1, et des anticorps anti-IgG humains (Fab') couplés à la fluorescéine. Les titres neutralisants sont exprimés comme la plus grande dilution qui protège 75 % des cellules de l'infection lorsque comparé au virus témoin.

++ Animaux ayant reçu une immunisation orale et une immunisation par voie parentérale.

+ Animaux ayant reçu une immunisation par voie parentérale.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS. — *Immunisation orale et parentérale des souris et évaluation des IgA.* — Les muqueuses buccales de 2 groupes de 10 souris BALB/c ont été mises en contact avec l'IMS-VIH, à 6 reprises sur une période de 3 semaines, en introduisant dans la bouche de l'animal, 100 µl de l'antigène (200 µg/ml) goutte à goutte. Un premier échantillon de salive a été prélevé 2 jours après la dernière immunisation orale, par lavage de la cavité buccale avec 100 µl de PBS. 3 semaines plus tard les souris ont reçu 10 µg d'IMS-VIH par voie intrapéritonéale et intramusculaire. Un autre groupe de 10 souris a été immunisé uniquement par voie parentérale avec la même quantité d'IMS-VIH. Les salives de toutes les souris ont été prélevées le lendemain de l'immunisation tel que décrit plus haut, et les sérums ont été prélevés une semaine plus tard. La présence des IgA dans la salive et dans les sérums a été déterminée par un test immunoenzymatique (ELISA) dans des plaques recouvertes de VIH-1 inactivés [10].

Il n'a pas été possible de mettre en évidence des quantités significatives de s-IgA dans la salive des souris en raison des difficultés rencontrées pour prélever leur salive. Toutefois, ce type d'immunisation a été très efficace pour sensibiliser le système immunitaire à une vigoureuse réponse humorale, incluant des IgA, à la suite d'une administration parentérale d'une faible quantité d'antigène. En effet, comme le montre le tableau I, les titres d'IgA sériques varient entre 1/800 et 1/6 400, la moyenne se situant à environ 1/3 000, et les titres IgM plus IgG se situent entre 1/25 600 et 1/819 200. De plus, tous ces sérums neutralisent l'infectivité du HIV-1 à une dilution de 1/80. Les animaux qui avaient reçu l'antigène uniquement par voie parentérale n'ont pas développé d'IgA circulants, à l'exception d'une seule souris qui présente un titre de 1/400. Les titres IgM plus IgG se situent entre 1/100 et 1/400. Aucun anticorps neutralisant n'a pu être mis en évidence dans ce groupe.

*Immunisation orale et parentérale des lapins et évaluation de l'immunité locale et humorale.* — Les groupes de 6 lapins ont été immunisés oralement tel que décrit pour la souris : six applications goutte à goutte au niveau des muqueuses buccales, réparties sur une période de 3 semaines, en utilisant 1 ml de l'IMS-VIH qui contenait 50 µg de gp 160. La présence d'IgA dans la salive a été vérifiée par ELISA dans des plaques recouvertes d'IMS-VIH-1, 2 jours après le dernier contact avec l'antigène [10]. Tous les animaux qui avaient reçu l'IMS-VIH par voie orale ont développé des s-IgA, spécifiques de la gp 160 dans la salive, à des titres allant de 1/20 à 1/1 024

TABLEAU II

Réponse immunitaire à une vaccination orale  
avec l'immunosome-VIH chez le lapin.

*Response after oral administration  
of HIV-IMS to rabbits.*

Lapins	Vaccin oral	Titre des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA <sup>(a)</sup>	
		Titre des s-IgA dans la salive	Titre des IgG dans le sérum
1. ....	IMS-VIH-1	20	<20
2. ....	IMS-VIH-1	256	<20
3. ....	IMS-VIH-1	128	<20
4. ....	IMS-VIH-1	256	<20
5. ....	IMS-VIH-1	512	<20
6. ....	IMS-VIH-1	>1 024	<20
7. ....	PBS	<10	<20
8. ....	PBS	<10	<20
9. ....	PBS	<10	<20
10. ....	PBS	<10	<20

<sup>(a)</sup> Les plaques ont été recouvertes avec les IMS-VIH. Des dilutions par deux de salives ou de sérums ont été incubées durant 2h à 37°C et la nuit à 4°C. Les anticorps liés à l'antigène ont été détectés avec un sérum anti-IgA, ou anti-IgG de lapins couplés à la peroxidase. Les titres sont exprimés comme la plus haute dilution donnant une densité optique à 490 nm supérieure à 0.2.

TABLEAU III

Réponse humorale à une vaccination orale suivie d'une immunisation  
par voie parentérale avec l'immunosome-VIH chez le lapin.

*Humoral response after oral and parenteral  
administration of HIV-IMS to rabbits.*

Lapins	Immunisation	Titre des anticorps spécifiques du VIH-1 par ELISA <sup>(a)</sup>		
		IgA	IgG	TN <sup>(b)</sup>
1. ....	++	160	320	40
2. ....	++	320	640	40
3. ....	++	80	160	40
4. ....	++	5 120	20 480	80
5. ....	++	80	160	40
6. ....	++	160	160	40
7. ....	+	<20	80	<10
8. ....	+	<20	80	<10
9. ....	+	<20	40	<10
10. ....	+	<20	<20	<10

<sup>(a)</sup> *Idem* tableau II.

<sup>(b)</sup> TN = titre des anticorps neutralisants. *Idem* tableau I.

++ Animaux ayant reçu une immunisation orale et une immunisation parentérale.

+ Animaux ayant reçu une immunisation parentérale.

(tableau II). Les lapins ont ensuite été vaccinés par voie intradermique avec 20 µg d'IMS-VIH. 1 semaine plus tard, des échantillons de sang ont été prélevés et les anticorps ont été titrés par ELISA. Tous les animaux qui avaient été immunisés oralement ont développé des IgA circulants spécifiques de la gp 160 du VIH-1, dont les titres varient entre 1/80 et 1/5 120. Les titres d'IgG se situent entre 1/160 et 1/20 480 (tableau III). Ces sérums neutralisent l'infectivité du VIH aux dilutions de 1/40 à 1/80. Comme le montre le tableau III, les animaux qui n'avaient reçu qu'une immunisation par voie parentérale n'ont pas développé d'IgA circulants et les titres IgG varient entre 1/40 et 1/160. Aucun anticorps neutralisant n'a pu être mis en évidence dans ce groupe.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — Nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle des contacts répétés des muqueuses buccales avec l'IMS-VIH, pourraient induire une réponse immunitaire locale par la production d'IgA sécrétoires. Des s-IgA spécifiques de la gp 160 du VIH-1 ont été mises en évidence dans la salive de tous les lapins qui avaient été immunisés oralement avec les IMS-VIH. Les taux d'anticorps très élevés, IgM et IgG que nous avons observés, tant chez la souris que chez le lapin aussitôt que 1 semaine après

l'immunisation parentérale, indiquent que l'immunisation orale a été efficace pour sensibiliser le système immunitaire à une réponse précoce suite à un deuxième contact avec l'antigène. Le niveau des IgA sériques dans les deux modèles expérimentaux est également très élevé, compte tenu qu'il y a beaucoup moins d'IgA qui sont produits que d'IgG ou IgM, en réponse à une stimulation antigénique[1]. Il est important de noter que les antigènes qui ne se répliquent pas n'induisent généralement pas d'IgA sériques[15]; seules les immunisations systémiques ou orales avec des antigènes dont la durée de vie est longue ont le pouvoir d'induire une réponse humorale de type IgA [16]. Que la demi-vie *in vivo* des Immunosomes soit plus longue que celle de la protéine isolée correspondante, est tout à fait vraisemblable et appuyée par des observations antérieures dans lesquelles, 30 jours après la dernière immunisation avec des Immunosomes-rabiques, les anticorps neutralisants continuaient toujours de monter [13].

Le rôle protecteur des s-IgA dans la transmission sexuelle du VIH n'a pas encore été démontré, cependant l'induction par la vaccination d'une immunité mucoale génitale est certainement grandement souhaitable. L'observation que des s-IgA sont présentes dans la salive des animaux qui ont été stimulés oralement par l'antigène et pas dans la salive de ceux qui n'ont été immunisés que parentéralement, suggère que, pour obtenir une immunité mucoale, une formulation efficace en application locale sur les muqueuses devrait être également développée. Les Immunosomes semblent être efficaces à la fois pour l'administration parentérale et pour une application locale.

Nous remercions grandement le Professeur Luc Montagnier pour nous avoir fourni le virus VIH (souche LAI) et le clone 13 des cellules CEM.

Cette recherche a été financièrement supportée partiellement par l'UNESCO et le Ministère de la Santé et du Bien Être Social du Canada (P.N.R.D.S.). Elle a été effectuée dans le cadre du groupe « L'Homme contre les Virus » créé par l'UNESCO, la F.E.R.S. et l'Académie européenne des Sciences, des Arts et des Lettres.

Note remise le 4 septembre 1991, acceptée le 11 septembre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. MESTECKY et J. R. MCGHEE, *Adv. Immunol.*, 40, 1987, à. 153-245.
- [2] J. C. PERKIN, D. N. TUCKER, H. L. S. KNOPF et coll., *Am. J. Epidemiol.*, 90, 1969, p. 319-326.
- [3] P. L. OGRA et S. S. OGRA, *J. Immunol.*, 110, 1973, p. 1307-1311.
- [4] J. R. MCGHEE et S. M. MICHALEK, *Ann. Rev. Microbiol.*, 35, 1981, p. 595-638.
- [5] K. C. BERGMAN et R. H. WALDMAN, *Rev. Infect. Dis.*, 10, 1988, p. 939-950.
- [6] C. J. MILLER, N. J. ALEXANDER, S. SUTJIPTO et coll., *J. Virol.*, 63, (10), 1989, p. 4277-4284.
- [7] D. W. ARCHIBALD, C. A. HEBERT, D. SUN et C. O. TACKET, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, 3, (10), 1990, p. 954-958.
- [8] L. THIBODEAU, P. NAUD et A. BOUDREAU, in *Genetic variation among Influenza viruses*, D. P. NAYAK éd., Academic Press, Inc., N. Y., 1981, p. 587-600.
- [9] P. PERRIN, L. THIBODEAU, C. DAUGUET, A. FRITSCH et P. SUREAU, *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 135 E, 1984, p. 183-199.
- [10] L. THIBODEAU, M. CHAGNON, L. FLAMAND, D. OTH, L. LACHAPELLE, C. TREMBLAY et L. MONTAGNIER, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 309, série III, 1989, p. 741-747.
- [11] D. OTH, G. MERCIER, P. PERRIN, M. L. JOFFRET, P. SUREAU et L. THIBODEAU, *Cell. Immunol.*, 108, 1987, p. 220-226.
- [12] P. PERRIN, M. L. JOFFRET, D. OTH, C. LECLERC, P. SUREAU et L. THIBODEAU, *Vaccine*, 6, 1988, p. 331-338.
- [13] P. PERRIN, L. THIBODEAU et P. SUREAU, *Vaccine*, 3, 1985, p. 325-332.
- [14] M. W. RUSSEL et J. MESTECKY, *Rev. Infect. Dis.*, 10 (suppl. 2), S440-6, 1988.
- [15] J. HURLIMANN et M. LICHAA, *J. Immunol.*, 116, 1976, p. 1295.
- [16] J. F. HEREMANS, in *The Antigen*, M. SELA éd., 2, 1974, p. 365, Academic Press, New York.

## Localisation histo-autoradiographique de l'americium dans les tissus des coquilles Saint-Jacques *Pecten maximus* : étude préliminaire sur les mécanismes de transfert à partir de l'eau de mer

Pierre MIRAMAND, Pierre GERMAIN et Eve BOUCAUD-CAMOU

**Résumé** — L'accumulation de l'americium à partir de l'eau de mer dans les tissus de coquilles Saint-Jacques *Pecten maximus* et sa localisation intracellulaire sont étudiées par histo-autoradiographie. Les plus fortes concentrations sont trouvées dans les masses viscérales où l'americium est localisé dans les cellules de la paroi stomacale, dans les cellules des canaux principaux et secondaires de la glande digestive et dans les cellules digestives en particulier sur les corps résiduels. Au vu de ces données, il est suggéré que la pénétration de l'americium dans les tissus de ce bivalve a lieu principalement par la voie digestive lorsque le vecteur contaminant est l'eau de mer.

### Histo-autoradiographic localization of americium in the tissues of the scallop *Pecten maximus* labelled from sea water: preliminary study on the transfer mechanisms

**Abstract** — The uptake of americium from sea water in the tissues of the scallop *Pecten maximus* and its intracellular localization have been studied by histo-autoradiography. The highest concentrations were found in the visceral mass where americium is present in the stomach wall cells, in the duct cells and in the digestive cells, in particular in the residual bodies. In view of these data, it is suggested that the penetration of Am into the tissues occurs mainly by the digestive pathway when the contaminating vector is the sea water.

**Abridged English Version** — The kinetics of accumulation and loss of transuranic elements in bivalve molluscs and the organotropism of these elements in the tissues are now well known ([2] to [11]). Nevertheless, the precise cytological localization of these accumulated elements and the exact physiological mechanisms of their penetration into the tissues of bivalve molluscs remain poorly known. In order to clarify these problems, the concentration and the distribution of  $^{241}\text{Am}$  in the tissues of the scallop *Pecten maximus* labelled from sea water have been studied and histo-autoradiography was used to localize the americium in the tissues. 36 scallops were labelled by exposure to sea water containing americium ( $1,667 \text{ mBq} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) during a period of 38 days. The labelling and histo-autoradiographic techniques have been described previously ([12], [14]).

The contamination factors CF ( $\text{cpm} \cdot \text{g}^{-1}$  wet weight/ $\text{cpm} \cdot \text{ml}^{-1}$  sea-water) attained after 38 days of exposure to sea water, in addition to relative americium distribution in the tissues, are given in Table. The visceral mass which encloses the digestive gland and the stomach shows a far higher accumulation of americium ( $\text{CF} = 1,450$ ), from 10 to 100 times more important than that observed in other tissues. The visceral mass is constituted by the stomach and the midgut surrounded by the digestive gland which is formed of numerous blind-ending tubules (the digestive tubules) communicating with the stomach by a sequence of branching ducts (*Fig.*). In auto-historadiographic preparations alpha tracks, due to americium, are localized in the epithelium of the stomach and in the cells of the digestive ducts (main and secondary) (*Figs. B, C, D*). In the digestive tubules, the alpha tracks are mainly found in the residual bodies, but the functional digestive parts of the tubules are also radioactive (*Fig. E*).

Note présentée par Lucien LAUBIER.



The visceral mass constitutes the soft tissue which stores americium in scallops. This characteristic appears to be shared with other bivalves, *Tapes decussatus* (CF = 850) [15], *Cerastoderma edule* (CF = 2,600) [9], *Mytilus galloprovincialis* (CF = 184) [16]. The digestive glands of other marine invertebrates studied show considerably lower tendency to concentrate this transuranic element when the contaminating vector is sea water alone,  $CF \leq 20$  for cephalopods, crustacean decapods or stellerids ([13], [16], [17]). The capacity of the lamellibranchs to concentrate americium in their visceral mass is probably linked with the nutritional physiology of these molluscs. The lamellibranchs filter large amounts of water to feed. The food particles are entangled in the mucus secreted by the gill filaments then conveyed to the mouth. The affinity of americium for mucopolysaccharides is well known ([5], [11], [15]). It is, thus, evident that the americium contained in sea water, either in a soluble form or fixed onto microparticles or bacteria, which can still be present after a single filtration through glass wool, is fixed on the mucus of the gills and then follows the pathways of digestive metabolism. Histo-autoradiography has permitted the visualization of the progress of the americium in the digestive pathways of the animals: the stomach epithelium shows numerous alpha tracks proving the presence of americium in the stomach lumen (*Fig. B*). The cells of the ducts of the digestive gland also showed considerable activity uptake (*Figs. C, D*) indicating that the americium had progressed in the ducts and had been submitted to the intracellular process in the digestive tubules as demonstrated by numerous alpha tracks in the digestive cells. In the digestive cells the major part of the americium was found in the residual bodies that they enclose (*Fig. E*). These residual bodies represent the final stage of the digestive processes in the lamellibranchs and following the breakdown of the digestive cells, they are released into the digestive gland ducts and through the stomach into the intestine where they are expelled with the faeces. This may explain the ability of lamellibranchs to eliminate accumulated americium when they are transferred to non-radioactive sea water [8]. These data suggest that the penetration of Am into the tissues of scallops occurs mainly by the digestive pathway when the contaminating vector is the sea water.

---

INTRODUCTION. — Depuis près de 20 ans, de nombreuses études sur le devenir biologique en milieu marin des éléments transuraniens, radionucléides de radiotoxicité élevée et de longues périodes en général, ont été entreprises [1]. Les mollusques bivalves qui représentent en milieu côtier des biomasses élevées ont fait l'objet de nombreux travaux menés au laboratoire ou *in situ*, ayant trait essentiellement à l'étude des cinétiques d'accumulation et de perte après marquage à partir de l'eau de mer ou de la nourriture, ainsi qu'à l'organotropisme de ces éléments dans les tissus ([2] à [11]). Cependant, la localisation précise au niveau cellulaire ainsi que les mécanismes physiologiques exacts de pénétration de ces éléments dans les tissus des mollusques bivalves restent peu connus. Pour essayer de répondre à ces questions, nous avons étudié la concentration et la distribution de l'américium-241 dans les tissus de coquilles Saint-Jacques *Pecten maximus* marquées au laboratoire à partir de l'eau de mer. L'histo-autoradiographie, technique ayant montré son grand intérêt dans des études précédentes ([9], [12], [13]) a été utilisée pour localiser l'américium dans les tissus.

MATÉRIELS ET MÉTHODES. — 36 coquilles Saint-Jacques d'un poids moyen d'environ 110 g accumulent l'américium à partir de l'eau de mer pendant une période de 38 jours.

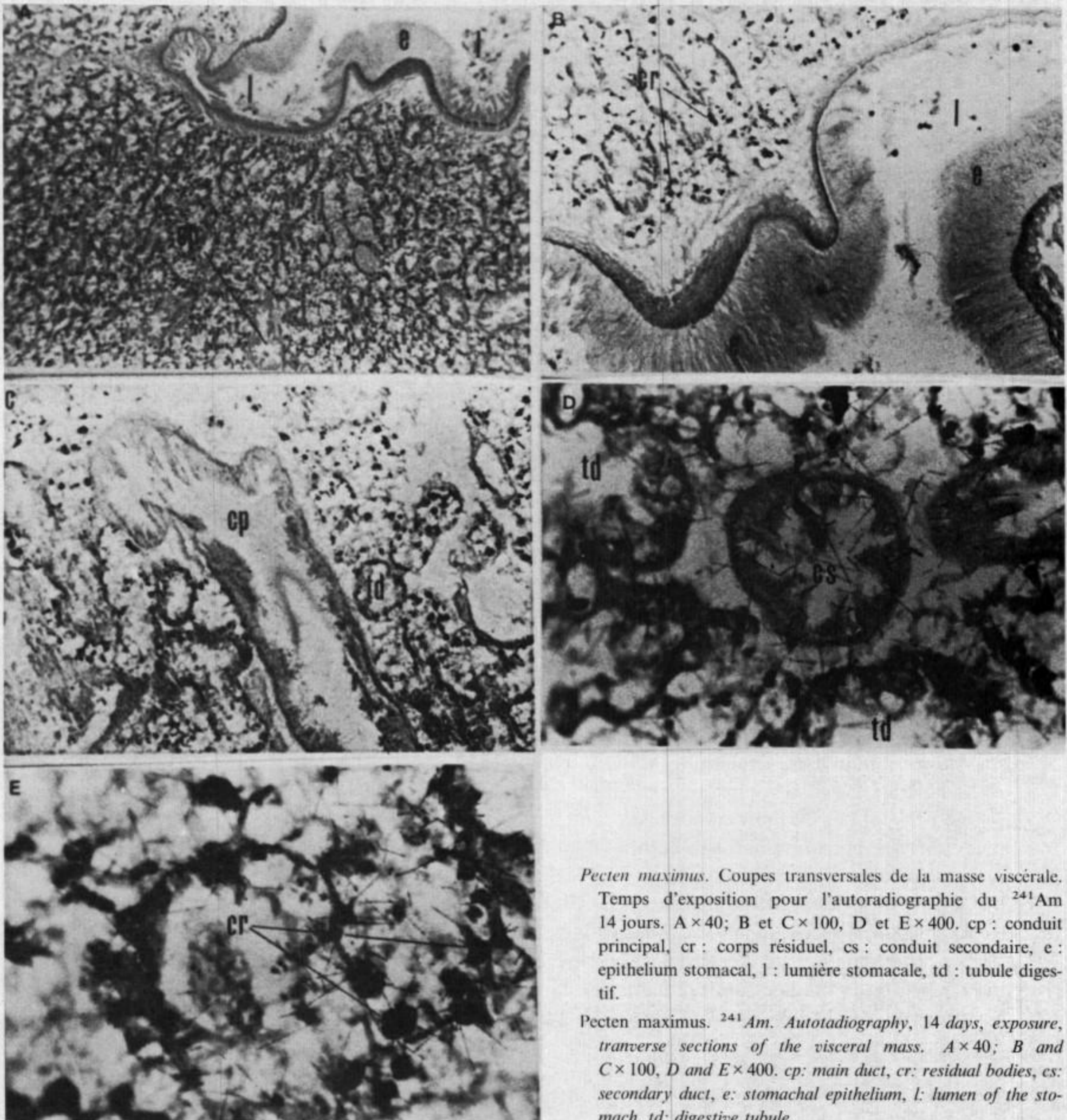
$^{241}\text{Am}$  (état d'oxydation 3, T 1/2 434 ans) a été préparé dans  $\text{HNO}_3$  1N par le Commissariat à l'Énergie atomique (France). Les coquilles sont placées, à raison de 12, dans des aquariums en plastique remplis avec 20 l d'eau de mer filtrée sur coton de verre ( $T=14\pm 1^\circ\text{C}$ ). Le  $^{241}\text{Am}$  est ajouté à une concentration de 1 667 mBq/ml (45 pCi/ml). La technique de marquage a été décrite précédemment [14]. A intervalles réguliers, 4 individus sont prélevés, pesés, rincés et disséqués (coquille, liquide palléal, manteau, branchies, muscles, masse viscérale, gonade et reins) et la concentration en americium est mesurée. Après 32 jours de marquage, environ 0,5 g de masse viscérale est prélevé sur les coquilles Saint-Jacques et placé dans un liquide fixateur (Bouin). Les tissus sont préparés pour l'histo-autoradiographie suivant la méthode décrite par Miramand et Guary [12].

RÉSULTATS. — Les facteurs de concentration FC ( $\text{cpm g}^{-1}$  poids frais/ $\text{cpm ml}^{-1}$  eau de mer) atteints après 38 jours de marquage à partir de l'eau de mer ainsi que la distribution relative de l'americium dans les tissus sont donnés dans le tableau. Les masses viscérales qui renferment la glande digestive et l'estomac montrent une accumulation extrêmement forte de l'americium ( $\text{FC}=1\,450$ ), d'environ 10 (reins) à 100 fois (muscles) supérieure à celle notée pour les autres tissus. Les masses viscérales contiennent ainsi près de 40 % de l'americium total et près de 80 % de l'americium trouvé dans les parties molles, alors que ces tissus représentent seulement 2 % du poids total de ces mollusques et 8 % du poids de leurs chairs.

La figure montre des coupes histologiques réalisées au niveau de la masse viscérale. Sur ces clichés sont visibles l'estomac, quelques conduits principaux et secondaires de la glande digestive ainsi qu'un grand nombre de tubules digestifs. Ces derniers sont formés de cellules claires et de cellules sombres. Les cellules claires sont les cellules digestives qui contiennent des sphères pigmentées en noir appelées corps résiduels lesquels sont les résidus de la digestion intracellulaire des particules digestives. Les cellules sombres, moins nombreuses, seraient des cellules sécrétrices d'enzymes digestifs. Entre ces 2 types cellulaires, du tissu conjonctif est visible alors que les amœbocytes circulants, trop petits, ne peuvent pas être mis en évidence.

Sur les préparations histo-autoradiographiques, les traces alpha dues à l'americium sont localisées : dans l'épithélium stomacal, dans les cellules des conduits principaux et secondaires de la glande digestive (*fig. B, C, D*) et dans les tubules digestifs. Dans ces derniers, les traces alpha sont situées principalement sur les corps résiduels contenus dans les cellules digestives. Les cellules sécrétrices sont également marquées (*fig. E*). A la fin du processus de digestion cellulaire, les corps résiduels sont émis dans les lumières des canaux de la glande digestive puis dans l'estomac où ils ont été observés marqués par l'americium.

DISCUSSION. — Les masses viscérales constituent le tissu mou qui stocke l'americium chez les coquilles Saint-Jacques. Cette particularité semble être partagée par d'autres bivalves : FC de 850 après 21 jours de marquage chez *Tapes decussatus* [15], FC de 2 600 après 38 jours de marquage chez *Cerastoderma edule* [9]. FC de 184 après 28 jours de marquage chez *Mytilus galloprovincialis* [16]. Les glandes digestives des autres invertébrés marins étudiés montrent une tendance considérablement moins forte à concentrer cet élément transuranien lorsque le vecteur contaminant est l'eau de mer seule : mollusques céphalopodes, FC de 20 après 15 jours de marquage chez *Octopus vulgaris* [17], crustacés décapodes, FC de 12 après 14 jours de marquage chez *Homarus gammarus* [13], astéries,



*Pecten maximus*. Coupes transversales de la masse viscérale. Temps d'exposition pour l'autoradiographie du  $^{241}\text{Am}$  14 jours. A  $\times 40$ ; B et C  $\times 100$ , D et E  $\times 400$ . cp : conduit principal, cr : corps résiduel, cs : conduit secondaire, e : epithelium stomacal, l : lumière stomacale, td : tubule digestif.

*Pecten maximus*.  $^{241}\text{Am}$ . Autotadiography, 14 days, exposure, transverse sections of the visceral mass. A  $\times 40$ ; B and C  $\times 100$ , D and E  $\times 400$ . cp: main duct, cr: residual bodies, cs: secondary duct, e: stomacal epithelium, l: lumen of the stomach, td: digestive tubule.

FC de 15 dans les caecum pyloriques de *Coscinasterias tenuispina* après 10 jours de contamination [16].

Cette capacité surprenante des mollusques bivalves à concentrer de façon très importante l'americium dans leurs masses viscérales est vraisemblablement liée à la physiologie de la nutrition de ces mollusques. En effet, les bivalves pour respirer et se nourrir filtrent de grandes quantités d'eau de mer. Les coquilles Saint-Jacques filtrent ainsi environ 10 l

TABLEAU

*Pecten maximus*. Facteurs de concentration (FC) et distribution (%) du  $^{241}\text{Am}$  dans les tissus des coquilles Saint-Jacques après 38 jours de marquage à partir de l'eau de mer ( $n=4$  individus) ( $\bar{X} \pm \sigma$ ).

*Pecten maximus*. Concentration factor (CF) and percentage content of  $^{241}\text{Am}$  in various tissues of the scallops after 38 d. exposure in contaminated sea water ( $n=4$  individuals).

	F.C.	% du $^{241}\text{Am}$ Total	% du poids Total	% du $^{241}\text{Am}$ par rapport aux chairs	% du poids par rapport aux chairs
Coquille . . . . .	65 ± 7	51,0 ± 8,0	63,0 ± 2,0	—	—
Liquide palléal . . . . .	11 ± 5	1,1 ± 0,8	7,1 ± 1,5	—	—
Chair (totale) . . . . .	140 ± 40	49 ± 8,0	30,0 ± 2,0	100	100
— Masse viscérale . . . . .	1 450 ± 370	39,0 ± 8,0	2,1 ± 0,2	77,0 ± 6,0	7,5 ± 0,7
— Muscle . . . . .	13 ± 4	1,9 ± 0,6	11,6 ± 1,1	4,0 ± 2,0	41,1 ± 3,9
— Gonade . . . . .	130 ± 30	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3
— Manteau . . . . .	38 ± 5	5,0 ± 1,0	10,7 ± 1,1	11,0 ± 4,0	37,9 ± 3,9
— Branchies . . . . .	69 ± 9	2,9 ± 0,4	3,3 ± 0,3	6,0 ± 2,0	11,6 ± 1,1
— Reins . . . . .	160 ± 80	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,6	0,8 ± 0,3

d'eau/jour. L'eau mise en mouvement par les cils des branchies pénètre dans la cavité palléale et passe obligatoirement sur les lamelles branchiales. Celles-ci secrètent en permanence du mucus qui normalement piège les particules alimentaires. Le mucus entraîné par les cils des lamelles branchiales est conduit aux palpes labiaux. Le mucus et les particules alimentaires qu'il englobe pénètrent alors dans l'œsophage très court puis dans l'estomac. Or l'affinité de l'americium pour les mucopolysaccharides est bien connue et a été mise en évidence chez de nombreux invertébrés marins ([5], [11], [15]). Il est alors évident que l'americium contenu dans l'eau de mer, soit sous forme soluble, soit fixé aux microparticules ou aux bactéries qui peuvent être présentes après une simple filtration sur coton de verre, vient se fixer au niveau du mucus des branchies et suit alors les voies de métabolisme digestif.

L'histo-autoradiographie permet alors de visualiser le cheminement de l'americium dans les voies digestives des animaux (*fig.*). En effet, les cellules de la paroi stomacale présentent de nombreuses traces alpha attestant obligatoirement une présence de l'americium dans la lumière stomacale et une perméabilité de ces cellules vis-à-vis de cet élément (*fig. B*). Les cellules des conduits principaux et secondaires de la glande digestive sont également bien marquées (*fig. C, D*). L'americium a donc bien transité dans ces conduits, et finalement est arrivé au niveau des tubules digestifs comme le montre la présence de nombreuses traces alpha dans les cellules digestives. La localisation de l'americium à l'intérieur même de tous ces types cellulaires montre leur perméabilité à cet élément artificiel. Les mécanismes de franchissement des parois cellulaires restent cependant inconnus. Dans les cellules digestives l'americium est présent en majorité au niveau des corps résiduels qu'elles renferment (*fig. E*). Ces corps résiduels représentent le terme ultime des processus de la digestion chez les bivalves. Après dégénérescence des cellules qui les contiennent, ils sont destinés à être rejetés dans les canaux de la glande digestive puis dans l'intestin où ils seront expulsés avec les fécès. Ceci pourrait expliquer pourquoi, remis dans une eau de mer propre, les mollusques bivalves ont la capacité d'éliminer l'americium qu'ils ont accumulé [8]. L'americium semble donc suivre chez les coquilles Saint-Jacques les voies du métabolisme digestif alors que le vecteur contaminant est l'eau de mer. Le marquage des cellules bordant les parois des différents canaux de la glande digestive atteste ce cheminement. La présence de l'americium dans les reins, le manteau,

la gonade et les muscles des coquilles (tableau) indique un transfert de cet élément par l'hémolymphe. L'americium circulant dans l'hémolymphe peut provenir de la glande digestive ou d'une pénétration à travers les épithéliums branchiaux ou tégumentaires. En ce qui concerne cette deuxième voie de marquage, il est peu probable que l'americium circulant dans l'hémolymphe soit extrait de celle-ci par les cellules des tubules digestifs. En effet, dans cette hypothèse, on devrait observer par histo-autoradiographie de nombreuses traces alpha entre les tubules digestifs, c'est-à-dire à l'endroit où se trouvent les amœbocytes circulants dont le pouvoir complexant vis-à-vis de nombreuses substances est bien connu. La figure montre bien que ce n'est pas le cas. L'americium contenu dans les cellules digestives provient donc bien de la voie digestive. Dans ce contexte, l'importance relative des 2 voies de transfert de l'americium (voie branchiale et tégumentaire et voie digestive) chez les coquilles Saint-Jacques devrait faire l'objet d'études ultérieures.

Note remise le 2 juillet 1991, acceptée le 16 septembre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. J. PENTREATH, in *Impacts of radionuclide releases into the marine environment*, I.A.E.A., Vienne, 1981, p. 241-272.
- [2] S. W. FOWLER, M. HEYRAUD et T. M. BEASLEY, in *Impacts of nuclear releases into the aquatic environment*, I.A.E.A., Vienne, 1975, p. 157-177.
- [3] J. C. GUARY et S. W. FOWLER, *Mar. Sci. Communs.*, 3, 1977, p. 211-229.
- [4] J. C. GUARY et A. FRAIZIER, *Mar. Biol.*, 41, 1977, p. 263-267.
- [5] E. I. HAMILTON et R. J. CLIFTON, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 3, 1980, p. 267-277.
- [6] J. C. GUARY et S. W. FOWLER, *Estuar. coast. Shelf Sci.*, 12, 1981, p. 193-203.
- [7] S. R. ASTON et S. W. FOWLER, *J. environ. Radioact.*, 1, 1984, p. 67-79.
- [8] P. BJERREGAARD, S. TOPCUOGLU, N. S. FISHER et S. W. FOWLER, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 21, 1985, p. 99-111.
- [9] P. MIRAMAND et P. GERMAIN, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 22, 1985, p. 59-68.
- [10] N. S. FISHER et J. L. TEYSSIE, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 28, 1986, p. 197-207.
- [11] P. MIRAMAND, P. GERMAIN et J. C. ARZUR, *J. environ. Radioact.*, 5, 1987, p. 209-218.
- [12] P. MIRAMAND et J. C. GUARY, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 4, 1981, p. 127-129.
- [13] P. MIRAMAND, P. GERMAIN et J. P. TRILLES, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 52, 1989, p. 217-225.
- [14] P. MIRAMAND, P. GERMAIN et H. CAMUS, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 7, 1982, p. 59-67.
- [15] M. C. GRILLO, J. C. GUARY et S. W. FOWLER, in *Impacts of radionuclide releases into the marine environment*, I.A.E.A., Vienne, 1981, p. 273-291.
- [16] J. C. GUARY, Recherches sur les transferts et la fixation du plutonium, de l'americium et du neptunium dans le milieu marin, *Thèse Doct. ès Sciences Naturelles*, Université d'Aix-Marseille-II, 1980.
- [17] J. C. GUARY et S. W. FOWLER, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 7, 1982, p. 327-335.

P. M. : *Institut national des Techniques de la Mer, Conservatoire national des Arts et Métiers,*  
B.P. n° 324, 50103 Cherbourg Cedex;

P. G. : *Commissariat à l'Énergie atomique, I.P.S.N., D.E.R.S., S.E.R.E.,*  
*Laboratoire de Radioécologie Marine,* B.P. n° 508, 50105 Cherbourg Cedex;

E. B.-C. : *Laboratoire de Zoologie, Université de Caen, 14032 Caen Cedex.*

## A genetic response to high altitude hypoxia: high hemoglobin-oxygen affinity in chicken (*Gallus gallus*) from the Peruvian Andes

Fabiola LEON VELARDE, Daniel ESPINOZA, Carlos MONGE C. and Christian de MUIZON

**Abstract** – A population of chicken (*Gallus gallus*) from the Peruvian Andes (4,000 m) carrying a high hemoglobin-oxygen affinity has been identified. This property remained stable after over 1 year residence at sea level and was transmitted to the descendants born at sea level. Chickens were introduced in South America during the Spanish conquest and therefore their adaptation time to high altitude is less than 500 years. This finding shows that a genotypic change in hemoglobin function can occur in an extremely short evolutionary time and leads to some reflections on the high altitude adaptation of the mammals that migrated to South America during the great Plio-Pleistocene interchange.

### Un cas de réponse génétique à l'hypoxie de haute altitude : découverte d'hémoglobine à haute affinité pour l'oxygène chez des poules (*Gallus gallus*) des Andes péruviennes

**Résumé** – Ce travail met en évidence l'existence d'une hémoglobine à haute affinité pour l'oxygène chez une population de poules (*Gallus gallus*) des Andes péruviennes. Aucune modification de ce caractère ne s'observe après un séjour d'un an au niveau de la mer; de plus, celui-ci a été transmis aux descendants nés au niveau de la mer. Les poules furent introduites en Amérique du Sud lors de la conquête espagnole ce qui implique que cette adaptation à la haute altitude est apparue en moins de 500 ans. Cette découverte montre qu'une modification génétique de la fonction de l'hémoglobine peut apparaître en un temps très court sur le plan évolutif et amène à quelques réflexions sur l'adaptation à la haute altitude des mammifères qui migrèrent en Amérique du Sud lors du grand interchange plio-pléistocène.

**Version française abrégée** – La plupart des mammifères et oiseaux vivant dans un environnement d'hypoxie de haute altitude présentent une hémoglobine à haute affinité pour l'oxygène ([1], [2]). Récemment, trois d'entre nous (F. L. V., D. E. et C. M. C.) ont découvert une population de poules (*Gallus gallus*) de l'Altiplano péruvien (département de Puno, 4 000 m) présentant une hémoglobine à haute affinité. En milieu de haute altitude, des poules ne possédant pas cette particularité sont atteintes de mal des montagnes chronique et présentent une très mauvaise capacité de reproduction [4]. Cette propriété, maintenue au niveau de la mer, est génétiquement transmissible. Les poules ayant été introduites en Amérique du Sud par les colons espagnols [3], force nous est d'admettre que cette transformation génétique a été acquise en moins de 500 ans, une vitesse d'évolution extrêmement rapide.

Le tableau récapitule les résultats. La courbe de la figure 1, nettement déjetée vers la gauche indique une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine. La technique utilisée est celle de Winslow [5].

Une hémoglobine à haute affinité ainsi que des mécanismes variés impliquant des mutations génétiques ont été observés chez plusieurs espèces d'oiseaux (*Anser indicus*, *Chloephaga melanoptera*, *Gyps rueppellii*, *Aegyptius monachus*) ([6] à [14]). Braunitzer et Hiebl [15] ont résumé ces travaux en mentionnant que la respiration en milieu de haute altitude n'est pas une caractéristique des oiseaux mais que l'adaptation à l'hypoxie de haute altitude est le résultat d'une mutation spécifique qui distingue une espèce de son plus proche parent vivant au niveau de la mer. Cette caractéristique a également été mise en évidence chez des mammifères

Note présentée par Philippe TAQUET.

des hautes Andes tels que des rongeurs caviomorphes et des camélidés ([16] à [19]). Les mécanismes qui régissent la haute affinité de l'hémoglobine sont fondamentalement différents chez les lamas et chez les chameaux ([20], [21]), ce qui démontre une acquisition indépendante de ce caractère; la présence d'une hémoglobine à haute affinité dans les deux groupes résulterait d'une évolution convergente sur le plan fonctionnel.

Si les caviomorphes sont connus en Amérique du Sud depuis l'Oligocène moyen (30 Ma), les Camelidae Lamini sont des immigrants récents venus d'Amérique du Nord à la fin du Pliocène (2 Ma) ([22], [23], [24]). Les Camelidae apparaissent en Amérique du Nord à l'Éocène supérieur [25] et les plus anciens Lamini sont connus au Miocène supérieur ([26], [27]). Les Camelidae Camelini envahirent l'ancien monde au Miocène supérieur [28], mais le dromadaire, venu d'Asie centrale, est un immigrant très récent (moins de 3 000 ans) en Afrique [29]. La haute affinité observée chez le dromadaire constitue donc peut-être la persistance d'une adaptation à l'altitude acquise au Plio-Pléistocène dans les hautes montagnes d'Asie centrale lors de la dispersion des Camelidae dans l'ancien monde.

En conséquence, il est vraisemblable que d'autres mammifères andins, descendants de migrants plio-pléistocènes, possèdent une hémoglobine à haute affinité. Parmi ces formes d'origine nord-américaine, carnivores fissipèdes, cervidés et rongeurs cricétidés sont abondants dans les hautes Andes. Des travaux en cours par les auteurs ont pour but de comparer l'affinité de l'hémoglobine de ces formes avec leurs plus proches parents connus en Amérique du Nord.

La découverte de poules présentant une hémoglobine à haute affinité dans les hautes Andes péruviennes, démontre qu'une réponse génétique au milieu agressif constitué par l'hypoxie d'altitude peut être quasi instantanée à l'échelle géologique; elle semble également éliminer la nécessité d'expliquer la haute affinité de l'hémoglobine des camélidés par un phénomène de « préadaptation » [30].

---

INTRODUCTION. — Most mammals and birds native to hypoxic environment of high altitude have hemoglobin with a high affinity for oxygen [1]. Genetic changes in the hemoglobin molecule have been supposed to be acquired over a long evolutionary time [2]; however, three of us (F. L. V., D. E. and C. M. C.) have found a population of chicken (*Gallus gallus*) from the Peruvian altiplano (Puno, 4,000 m) with hemoglobin of high affinity for oxygen. This property remained stable at sea level for three generations. High hemoglobin-oxygen affinity has also been recorded in another chicken population at La Raya (4,300 m., Cuzco Department).

Chicken were introduced in South America during the Spanish conquest [3] and therefore they have an adaptation time to high altitude of less than 500 years, a very short evolutionary time. It is well known that sea-level chicken introduced in high altitude, show poor hatchability and chronic mountain sickness [4]. Since hemoglobins of functionally high affinity seem to be specifically related to hypoxic environments, our finding of a poor-flyer domestic sea-level bird carrying a hemoglobin with functional high affinity is of biological significance. This may be the first time that a genotypic hemoglobin characteristic has been shown to be acquired in a known period of time and in natural conditions.

This paper discusses the biological significance of fast acquisition of hemoglobin of high affinity which should be taken into consideration in the interpretation of the evolutionary adaptation to high altitude of mammals and birds.

METHODS AND RESULTS. — The technique used for the determination of the hemoglobin affinity was that described by Winslow [5]. It has the advantage of recording the equilibrium curve in about 10 min., thus avoiding much of the metabolic effect produced by nucleated red cells. The blood was equilibrated at 41°C for 20 min. with a gas mixture containing a  $P_{CO_2}$  of 40 mmHg in nitrogen. It was transported to a mixing chamber and oxygenated with oxygen peroxide in the presence of catalase. The  $P_{CO_2}$  was kept constant by addition of alkali. A continuous recording of the curve was obtained by means of a  $P_{CO_2}$  electrode. The Bohr factors for sea-level and high-altitude birds were determined independently. Using these factors the hemoglobin-oxygen affinity values ( $P_{50}$ ) were corrected at standard bird pH of 7.5 ( $P_{50std}$ ).

Table I contains the blood parameters obtained after the *in vitro*  $P_{50}$  determination. It may be seen that both the uncorrected  $P_{50}$  and the  $P_{50std}$  values were highly significantly different between sea level (SL) and altitude (ALT) chicken. The Hill shape parameter ( $n$ ) was almost identical between the two groups. The  $P_{CO_2}$  of the equilibrated blood was not significantly different between SL and ALT, nevertheless the blood pH was lower in ALT blood. This possibly indicates a smaller buffer capacity of ALT blood. The hemoglobin concentration was similar in both groups (the animals were all studied at sea level). Figure 1 shows the oxygen equilibrium curve of SL chicken compared to that of Puno chicken (ALT). The curves were constructed with the average values presented in Table. There is a marked shift to the left of the high altitude curve indicating an increased hemoglobin affinity.

DISCUSSION. — (1) *Previous data.* — High hemoglobin oxygen affinity has been recorded in several birds and mammals living in high altitude. The hemoglobin-oxygen affinity of birds has received considerable attention ([6] to [10]). Hiebl *et al.* [11] propose a cascade-like mechanism for the high-altitude respiration of the bar-headed goose (*Anser indicus*) of the Himalayas. The mechanism concerns a possible switch from hemoglobin A having alanine at position 119 and hemoglobin B having proline at the same position. A single point mutation in  $\beta 55$  of the hemoglobin of the Andean goose (*Chloephaga melanoptera*) has been considered beneficial for life at high altitude [12]. In the case of Ruppel's griffon (*Gyps rueppellii*), a bird which has been found flying at 11,300 m, the occurrence of four hemoglobins has been described [13]. The studies predict three levels of affinity: low affinity Hb A, Hb A' of intermediate affinity and high affinity Hb D/D. A cascade-like mechanism has been postulated like in the bar-headed goose but with the interplay of four hemoglobins instead of two. This work has been extended to the black vulture (*Aegypius monachus*), also a high altitude flyer [14]. Braunitzer and Hiebl [15], summarizing these studies have stated: "high-altitude respiration is not a general characteristics of birds: the adaptation to high altitude is the result of a specific mutation, thus distinguishing a species from its closest relatives in the low land".

High hemoglobin-oxygen affinity is also present in several Andean mammals such as caviomorph rodents: chinchilla (*Chinchilla chinchilla*) [16], viscacha (*Lagidium peruanum*) [17], Guinea pig (*Cavia porcellus*) [18] and camelids (llama, vicugna, guanaco and alpaca) [19]. In the Lamini, high hemoglobin-oxygen affinity is achieved by a genetic control which reduces the effect of the non- $\alpha$  chains to 2-3 biphosphoglycerate. The reduced effect has been interpreted as a mutation ( $\beta 2$  his-asn) and an interruption of the phosphate contact in  $\alpha 2$  asparagine resulting in an increased oxygen affinity. Beta2 asn is present in alpaca and vicugna too; so, it seems likely that this mutation appeared in the common



TABLE

Oxygen equilibrium parameters of sea level and high-altitude chicken blood after the *in vitro* P<sub>50</sub> determination.  
Number of animals in parenthesis.

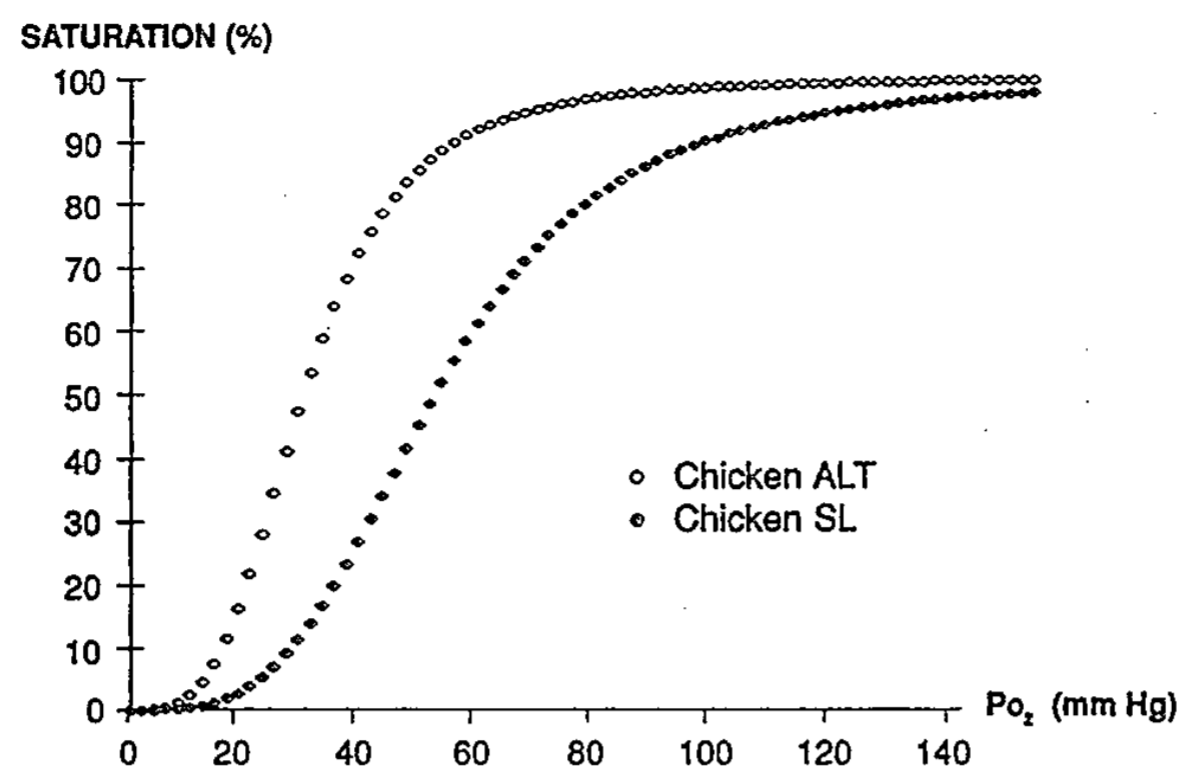
*Paramètres de la liaison de l'oxygène à l'hémoglobine chez des poules du niveau de la mer  
et chez des poules d'altitude.*

CHICKEN		Hb (g/dl)	pH	P <sub>CO<sub>2</sub></sub> (mm Hg)	n	P <sub>50</sub> (mm Hg)	BOHR	P <sub>50</sub> std (mm Hg)
SL (8)	MEAN	9.8	7.478	39.4	3.45	51.9	-0.375	50.9
	SE	0.40	0.04	2.56	0.23	2.89	0.033	2.82
ALT (9)	MEAN	9.0	7.329	38.3	3.48	35.6	-0.505	28.9
	SE	0.82	0.04	3.69	0.17	2.01	0.055	0.87
	P	0.585	0.012	0.800	0.922	0.000	0.097	0.000

ancestor of guanaco and vicugna (possibly the genus *Hemiauchenia*) which gave rise to the domestic forms, lama and alpaca. This genetic control differs from that in *Camelus* which has an allosteric control of the hemoglobin chain itself, *i.e.* it is phosphate independent ([20], [21]). These mechanisms are fundamentally different and therefore strongly suggest an independent acquisition of high hemoglobin-oxygen affinity in living *Camelus* and living Lamini; it also demonstrates that it is not an inherited character (symplesiomorphy) from a common Miocene ancestor. Consequently, the most economic hypothesis is to suppose that Lamini and Camelini acquired independently high hemoglobin-oxygen affinity when, dispersing out of North America (see below), they were exposed to high-altitude hypoxia; the high hemoglobin-oxygen affinity in both groups would be the result of convergent evolution as far as the function is concerned.

(2) *Paleontological context.* — Although the paleontological record of high-altitude birds is poorly documented, in the case of mammals it is possible to attempt an integration of the functional and molecular basis of hemoglobin affinity with the evolutionary records of some mammalian species. Furthermore, consideration of the paleobiogeographic history of the south American mammal fauna gives an interesting dimension to the observations mentioned above.

Caviomorph rodents are early immigrants in South America as the oldest known remains are from the middle Oligocene, *i.e.* approx. 30 Ma ([22], [23]). High hemoglobin-oxygen affinity has probably been acquired by caviomorph rodents during the Oligocene since they are known in the Bolivian Andes at that time [23]. Camelids are Plio-Pleistocene invaders which migrated from North to South America with the second wave of dispersal of the great Plio-Pleistocene American interchange as defined by Marshall [24], *i.e.* 2 Ma ago. Camelidae originated in North America at the Late Eocene [25] and the oldest known Lamini are from the late Miocene (*i.e.* approx. 10 Ma) of U.S.A. ([26], [27]). Camelini invaded the old world during the Miocene as they are known in Late Miocene deposits from Spain [28]; however, the living dromedary is a very recent immigrant in Africa (2,720 y B.P.), [29]. Although the dromedary does not live in high altitude, it shows high hemoglobin-oxygen affinity [20]. This could be regarded as an ancestral feature retained by the dromedary and probably acquired by the common ancestor of *Camelus bactrianus* and *C. dromedarius* in the Central Asiatic mountains during the Asiatic dispersal event which characterized the Neogene evolution of the Camelini. In this respect, it is noteworthy that once the high-affinity function has been acquired, it may remain fixed for prolonged periods at sea level as European laboratory Guinea pigs still show this property [18].



Oxygen equilibrium curves of the blood in sea-level (SL) and high-altitude chicken (ALT). Curves recorded after sea level acclimatization. The ALT curve is markedly displaced to the left, indicating a high-affinity hemoglobin in the birds native to the mountains and residing at sea level. Each curve has been constructed with the average values presented in Table.

*Courbe de liaison de l'oxygène dans l'hémoglobine du sang chez des poules du niveau de la mer (SL) et chez des poules d'altitude (ALT) après acclimatation au niveau de la mer. La courbe ALT est nettement déplacée vers la gauche indiquant une haute affinité de l'hémoglobine chez les oiseaux originaires de la montagne et résidant au niveau de la mer.*

Therefore, it is possible that the descendants of other Plio-Pleistocene immigrant land-mammals living in the Andes could present high hemoglobin-oxygen affinity. Among them fissiped carnivores and cervids are abundant in the Andes. Interesting examples are the puma (*Felis concolor*), the Virginian deer (*Odocoileus virginianus*) and the long tailed weasel (*Mustela frenata*) which are known at sea level or low altitude in North America and at high altitude in the Andes, although none of them are as strictly related to high altitude as are the Andean camelids. Studies by the authors are in progress to compare hemoglobin-oxygen affinity of several Plio-Pleistocene immigrants of the high Andes and in their closest relatives at sea level in North- or South-America in order to analyse their genetical response to high-altitude hypoxia. So far, high oxygen affinity has been undoubtedly recorded in the Andean fox (*Dusicyon culpaeus*) and in the Andean cat (*Felis jacobita*).

**CONCLUSION.** — Our finding that a genetic change in the hemoglobin function resulting in high affinity for oxygen can be acquired in a short evolutionary time suggests that there is no need to postulate a continuous phylogenetic presence of this physiological property in mammals and birds. On the contrary, it indicates the possibility that this genetic change can occur even if the species is exposed to a mountain environment for a very short time. It also seems to eliminate the need to postulate the so called "preadaptation" to high altitude of the family Camelidae suggested by some authors [30].

The study was made possible by partial funding of the CONCYTEC. Special thanks are due to F. Cuentas for building the measurement apparatus.

Note remise le 24 avril 1991, acceptée après révision le 13 août 1991.

#### REFERENCES

- [1] C. MONGE C. and J. WHITTEMBURY, in *Environmental Physiology of Animals*, London, Blackwell Scientific Pub., 1976, pp. 289-308.
- [2] D. J. FUTUYMA, *Evolutionary biology*, Sinauer associates inc., 1979, pp. 1-565.

- [3] O. M. DUNIN-BORKOWSKI, Gallina Araucana Prehispánica: Mito o Realidad?, *Thesis (Magister)*, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 1986, pp. 1-97.
- [4] A. H. SILLAU, S. CUEVA and P. MORALES, *Pfluegers Arch.*, 386, 1980, pp. 269-275.
- [5] R. M. WINSLOW, J. M. MORRISSEY, R. L. BERGER, P. D. SMITH and C. C. GIBSON, *J. Appl. Physiol.*, 45, 1978, pp. 289-297.
- [6] F. G. HALL, *J. Biol. Chem.*, 115, 1936, pp. 485-490.
- [7] P. L. LUTZ, *Am. Zool.*, 20, 1980, pp. 187-198.
- [8] J. P. HOLLE, M. MEYER and P. SCHEID, *Respir. Physiol.*, 29, 1977, pp. 355-361.
- [9] C. P. BLACK and S. M. TENNEY, *Respir. Physiol.*, 39, 1980, pp. 217-239.
- [10] D. C. ESPINOZA, La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en la gallareta (*Fulica americana peruviana*) y su implicancia eco-fisiológica. *Thesis (Bachiller)*, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 1988, pp. 1-46.
- [11] I. HIEBL, D. SCHNEEGANSS and G. BRAUNITZER, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 367, 1966, pp. 591-599.
- [13] I. HIEBL, R. E. WEBER, D. SCHNEEGANSS and G. BRAUNITZER, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 369, 1988, pp. 217-232.
- [14] R. E. WEBER, I. HIEBL and G. BRAUNITZER, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 369, 1988, pp. 233-240.
- [15] G. BRAUNITZER and I. HIEBL, *Naturwissenschaften*, 75, 1988, pp. 280-287.
- [16] H. CHIODI, *Acta Physiol. Latinoam.*, 12, 1962, pp. 208-209.
- [17] F. G. HALL, D. B. DILL and E. S. GUZMAN BARRON, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 8, 1936, pp. 301-313.
- [18] Z. TUREZ, B. E. M. RINGNALDA, O. MORAN and F. KREUZER, *Pfluegers Arch.*, 335, 1980, pp. 109-115.
- [19] H. CHIODI, *Resp. Physiol.*, 11, 1970/1971, pp. 84-93.
- [20] G. BRAUNITZER, *Vehr. Dtsch. Zool. Ges.*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1980, pp. 202-213.
- [21] T. KLEINSCHMIDT, J. MARZ, K. D. JURGENS and G. BRAUNITZER, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 367, 1986, pp. 153-160.
- [22] G. G. SIMPSON, *Splendid Isolation: The Curious History of South American Mammals*, Yale University Press, 1980, pp. 1-266.
- [23] R. HOFFSTETTER and R. LAVOCAT, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 271, série D, 1970, pp. 172-175.
- [24] L. G. MARSHALL, in *The Great American Biotic Interchange*. Plenum Press, 1985, pp. 49-85.
- [25] C. L. GAZIN, *Smiths. misc. Colls*, 153 (4), 1955, pp. 1-90.
- [26] D. WEBB, *Bull. Los Angeles County Mus. Sci.*, 1, 1965, pp. 1-54.
- [27] D. WEBB, in *Pleistocene Mammals of Florida*, University Press of Florida, Gainesville, 1976, pp. 170-213.
- [28] J. MORALES, D. SORIA and E. AGUIRRE, *Estudios geol.*, 36, 1980, pp. 139-142.
- [29] H. LHOÏTE, *Chameau et dromadaire en Afrique du Nord et au Sahara. Recherches sur leurs origines*, Office national des Approvisionnements et des Services agricoles (ONAPSA), 1987, pp. 1-161.
- [30] C. MONGE C., *Interciencia*, 14, 1989, p. 7.

F. L. V., D. E. et C. M. : *Departamento de ciencias fisiológicas, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Apartado 5045, Lima 100, Peru;*

C. M. : *U.R.A. n° 12, C.N.R.S., Institut français d'Études andines, Cas n° 18-1217, Lima 18, Peru.*

Reproduction animale/*Animal Reproduction*

## Le thymus fœtal et la thymuline stimulent la prolifération des ovogonies dans l'ovaire fœtal de rat *in vitro*

Jacques PREPIN

**Résumé** — Le nombre des cellules germinales présentes dans les ébauches ovariennes de fœtus de rat, prélevées à 13,5 p.c. et placées *in vitro*, est plus élevé si les ovaires sont co-cultivés avec du thymus fœtal ou quand le milieu est supplémenté en thymuline que dans des ovaires cultivés dans du milieu frais. De plus, l'addition de corticostérone dans le milieu de culture prévient la sécrétion de thymuline par le thymus et la stimulation de la prolifération des ovogonies dans les ovaires co-cultivés dans ces conditions n'a pas lieu. Comme nos travaux antérieurs avaient montré que l'hypophysectomie fœtale avait pour conséquence d'accroître la multiplication des cellules germinales ovariennes, l'ensemble des résultats suggère que l'axe hypophyso-corticosurrénalo-thymique pourrait être impliqué dans le contrôle de la prolifération des ovogonies *in vivo*.

### Thymus and thymulin increase the proliferation of oogonia in foetal rat ovary *in vitro*

**Abstract** — In rat ovaries explanted on day 13,5 p.c. and cultured *in vitro* for up to 6 days, the number of germ cells is enhanced in thymulin-supplemented medium and/or after co-culture of the ovarian explants with foetal thymic tissue compared to ovaries cultured in synthetic medium. Corticosterone added to the medium prevents the secretion of thymulin by the foetal thymus and in that condition the thymus does not influence the proliferation of oogonia. These results provide additional evidence that the pituitary-adrenal-thymic axis might be involved in the control of oogonia proliferation *in vivo*, taking into account our previous experimental finding that the number of germ cells is increased in ovaries of hypophysectomized foetuses.

**Abridged English Version** — We recently reported that hypophysectomy in foetal rabbit increased the proliferation of oogonia in foetal ovaries compared to controls [1]. In view of the fact that hypophysectomy in the foetus induces hypertrophy of the thymus [2] which can be prevented by ACTH administration [3], we hypothesized that hypophysectomy also stimulates the production of a thymic factor which increases oogonia proliferation.

To determine if the thymus and/or thymic hormones have such an action on oogonia proliferation, we performed *in vitro* experiments. The techniques employed for the explantation of gonads and their associated mesonephroi, the culture *in vitro* and the identification of the sex of the rat foetuses are reported elsewhere ([5], [6]). Germ cell counting was done in serial sections of each pair of the explanted ovaries.

In a first set of experiments, we compared the number of oogonia present in foetal ovaries explanted on day 13.5 and cultured *in vitro* from 3 to 6 days: 1) in fresh synthetic medium CMRL 1066; 2) in co-culture with immersed fragments of thymus from 17-day-old foetuses; 3) in medium containing 125 µg/ml or 1 pg/ml of thymulin (Bachem, Switzerland). The number of oogonia was significantly increased in ovaries co-cultured with thymus or cultured in medium supplemented with thymulin compared to ovaries grown in synthetic medium (Table).

Secretion of thymulin in the culture medium by foetal thymus was demonstrated by the use of a bioassay based on the ability of thymulin to restore the inhibitory effect of azathioprine on rosette formation in spleen cells from adult thymectomized mice [7] (study made by M. Dardenne).

In a second set of experiments, we compared the number of oogonia present in foetal rat ovaries explanted on day 13.5 and cultured *in vitro* for 4 days: 1) in medium supplemented

Note présentée par Jean-François BACH.

with 1 pg/ml of thymulin, changed every day; 2) in medium supplemented with 10 pg/ml of thymopentin which corresponds to the biological active residues of the thymopoietin [9]; 3) in medium supplemented with 100 µg/ml of corticosterone; 4) with immersed fragments of thymus from 17-day-old foetus; 5) in co-culture with immersed fragments of thymus removed on day 16 p.c. in medium supplemented with 100 µg/ml of corticosterone, changed the following day, concomitant with the addition of the ovaries in the culture dish; 6) in co-culture with immersed fragments of foetal spleen.

The number of germ cells was significantly increased in ovaries cultured in medium supplemented with thymulin or co-cultured with fragments of thymus when compared to ovaries grown in fresh medium. In contrast, for the rest of the experimental conditions, increase in numbers of germ cells failed to occur. Additionally, the presence of corticosterone in the medium prevented the fragments of thymus from secreting thymulin.

The data mentioned in the first set of experiments indicate that the period of sensibility to the stimulation of the oogonia proliferation by thymulin occurs between the day of explantation *i.e.* 13.5 days p.c. and the 3rd day in culture, corresponding to 16.5 days p.c., when the extensive multiplication of oogonia occurs *in utero* [12].

In summary, the present results considered in addition to the fact that hypophysectomy increases the number of germ cells [1] indicate that the pituitary-adrenal-thymic axis might be involved in the regulation of oogonia proliferation *in vivo*.

---

INTRODUCTION. — Récemment, nous avons montré que l'hypophysectomie par décapitation *in utero* stimulait la multiplication des ovogonies dans l'ovaire fœtal de lapin [1]. L'interprétation de ce résultat suggérait que la décapitation des fœtus, connue pour induire une hypertrophie du thymus [2] qui peut être corrigée par l'administration d'ACTH [3], pourrait éventuellement stimuler la production, par le thymus, d'un facteur sérique responsable de la stimulation de la prolifération des ovogonies.

Le but de la présente Note est d'apporter la preuve que le thymus fœtal, en sécrétant *in vitro* de la thymuline stimule les mitoses ovogoniales.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — On a utilisé des rats Wistar CF (souche du C.N.R.S.), l'âge des fœtus est compté à partir de l'heure estimée de l'ovulation, soit 2 h du matin [4]. Les femelles gestantes sont reconnues par palpation 13 jours après la nuit de la cohabitation avec un mâle.

Les techniques de culture et de détermination du sexe des fœtus ont été rapportées antérieurement ([5], [6]). Les deux ovaires des fœtus de 13,5 jours sont prélevés ensemble avec leur mésonéphros et cultivés sur grille.

Les thymus de fœtus de 16 ou 17 jours (*cf.* première ou deuxième série d'expériences) et la rate de fœtus de 17 jours sont coupés en fragments de 1 m<sup>3</sup> environ, avant d'être placés en culture, immergés dans 0,8 ml de milieu CMRL 1066 (Eurobio, Paris) additionné d'antibiotiques.

Les cultures ont été maintenues à 36 ± 1°C dans un mélange gazeux comprenant 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'air. Au terme de la période de culture, les explants sont fixés dans le liquide de Bouin et les coupes sériées sont colorées à l'hématoxyline-éosine. Les cellules germinales sont dénombrées dans les coupes sériées de chaque paire d'ébauches ovariennes.

La sécrétion de thymuline dans les milieux de culture par les fragments de thymus a été mise en évidence en utilisant un test biologique fondé sur la capacité de restaurer

TABLEAU

Nombre de cellules germinales présentes dans les deux ovaires  
prélevés sur des fœtus de 13,5 jours et placés en culture *in vitro* <sup>(a)</sup>

*Number of germ cells in both ovaries  
from 13.5 day-old fetuses and cultured for 4 days in vitro.*

Nombre de jours de culture  
(le nombre de cultures est indiqué entre parenthèses)

Condition de culture	3	4	5	6
Milieu frais . . . . .	5 579 ± 291 (12)	15 449 ± 1 090 (20)	6 114 ± 816 (6)	5 480 ± 422 (13)
Co-culture avec du thymus . . . . .	9 527 ± 369 <sup>(b)</sup> (11)	21 503 ± 582 <sup>(c)</sup> (14)	10 108 ± 668 <sup>(b)</sup> (9)	—
Co-culture avec de la rate . . . . .	—	14 847 ± 453 <sup>(d)</sup> (7)	—	—
Thymuline (125 mg/ml) . . . . .	17 345 ± 954 <sup>(b)</sup> (8)	24 424 ± 648 <sup>(b)</sup> (15)	15 767 ± 766 <sup>(b)</sup> (9)	13 032 ± 1 388 <sup>(b)</sup> (8)
Thymuline (1 pg/ml) . . . . .	—	23 105 ± 1 308 <sup>(b)</sup> (6)	—	—
Thymuline (1 pg/ml) (*) . . . . .	—	23 241 ± 647 <sup>(b)</sup> (4)	—	—
Thymopentine (10 pg/ml) . . . . .	—	13 332 ± 905 <sup>(d)</sup> (5)	—	—
Milieu frais + corticostérone (100 µg/ml) . . . . .	—	14 457 ± 967 <sup>(d)</sup> (5)	—	—
Co-culture avec thymus + cortico- stérone (100 µg/ml) . . . . .	—	14 524 ± 777 <sup>(d)</sup> (6)	—	—

(\*) Milieu changé chaque jour.

(\*) *Medium changed every day.*

<sup>(a)</sup> Nombre moyen + S.E.M.

<sup>(a)</sup> *Number of germ cells in both ovaries explanted from 13.5-day-old fetuses (values are mean + S.E.M.).*

<sup>(b)</sup> (P < 0,001), <sup>(c)</sup> (P < 0,01), <sup>(d)</sup> (différence non significative) par rapport aux ovaires cultivés dans du milieu frais (test *t* de Student).  
*Significant difference when compared with ovaries cultured in fresh medium (Student's t test).*

l'effet inhibiteur de l'azathioprine sur la formation de rosettes chez les souris thymectomisées (étude faite par M. Dardenne) [7].

*Première série d'expériences.* — Les ébauches ovariennes ont été cultivées pendant 3 à 6 jours : 1) dans du milieu frais; 2) en co-culture avec quatre fragments de thymus de fœtus de 17 jours prélevé le matin et placés *in vitro*; les ovaires sont prélevés l'après-midi du même jour, puis introduits dans les boîtes de culture; 3) dans du milieu additionné de 125 µg/ml ou 1 pg/ml de thymuline (Bachem, Suisse). Cette dernière concentration est environ quatre fois plus élevée que la concentration plasmatique d'un humain adulte [8].

*Deuxième série d'expériences.* — Les ébauches ovariennes ont été cultivées pendant 4 jours : 1) dans du milieu frais additionné de 1 pg/ml de thymuline, renouvelé toutes les 24 h, ou de 10 pg/ml de thymopentine, pentapeptide constituant la séquence biologiquement active de la thypopoiétine, autre hormone thymique [9], ou bien encore de 100 µg/ml de corticostérone, concentration 5 à 6 fois plus élevée que la concentration plasmatique d'un fœtus de rat de 17,5 jours ([10], [11]); 2) avec des fragments de thymus prélevés à 16 jours et cultivés dans du milieu additionné de 100 µg/ml de corticostérone, le même milieu est renouvelé le jour suivant, juste avant que les ébauches ovariennes soient placées dans les boîtes de culture; 3) avec des fragments de rate prélevés le même jour et cultivés dans du milieu frais.

RÉSULTATS. — Le tableau montre l'ensemble des résultats. Dans les ébauches ovariennes explantées à 13,5 jours et cultivées *in vitro* pendant 3 à 6 jours dans du milieu frais, le nombre des cellules germinales augmente pendant les 4 premiers jours de culture puis

décroît rapidement. Cette évolution confirme les résultats déjà rapportés à la suite d'observations faites *in vivo* [12] et *in vitro* [5].

Cependant, si on considère qu'au moment de l'explantation des ébauches ovariennes, à 13,5 jours p. c., le nombre des cellules germinales présentes dans les deux gonades, est d'environ 2 500 ([5], [13]), après 3 jours de culture, le nombre des cellules germinales est multiplié par 2,2 dans les ovaires cultivés dans du milieu frais, par 3,8 dans les ovaires co-cultivés avec des fragments de thymus et par 6,9 lorsque de la thymuline a été ajoutée au milieu de culture.

Après 4, 5 ou 6 jours de culture, le nombre des cellules germinales est toujours plus élevé dans les ovaires cultivés dans du milieu supplémenté en thymuline, ou en présence de thymus que dans des ovaires cultivés dans du milieu frais.

Les différentes concentrations de thymuline présentes dans le milieu de culture (125 µg/ml ou 1 pg/ml) ou bien le renouvellement quotidien du milieu de culture supplémenté en thymuline ne modifient pas le taux de prolifération des ovogonies puisque les nombres de cellules germinales ne sont pas significativement différents après 4 jours de culture.

Les fragments de thymus cultivés *in vitro* libèrent dans le milieu de culture une quantité non négligeable de thymuline; cette sécrétion est inhibée lorsque de la corticostérone est ajoutée au milieu de culture.

Les cellules germinales dénombrées dans les ébauches ovariennes cultivées pendant 4 jours dans du milieu neuf, ou additionné de corticostérone, ou de thymopentine, ou bien co-cultivées avec des fragments de rate ou bien encore avec des fragments de thymus dans du milieu supplémenté en corticostérone, ne sont pas statistiquement différentes.

DISCUSSION. — Les résultats indiquent que le thymus stimule *in vitro* la prolifération des ovogonies, contrairement à la rate, autre organe lymphoïde. Ils montrent aussi que le thymus exerce son activité en libérant de la thymuline dans le milieu de culture et que celle-ci est probablement la seule hormone thymique impliquée dans la stimulation de la multiplication des cellules germinales ovariennes puisque cette dernière n'a pas lieu quand de la thymopentine est ajoutée au milieu de culture.

Après 3 jours de culture, le nombre de cellules germinales est au plus haut dans les ébauches ovariennes cultivées en présence de thymuline, il est moindre dans les ovaires co-cultivés avec des fragments de thymus, et bien inférieur quand les ovaires sont cultivés dans du milieu frais.

Au cours des 3 jours suivants *in vitro*, et à chaque stade, les différences entre les nombres de cellules germinales présentes ne varient guère que les ovaires soient cultivés dans du milieu frais, co-cultivés avec des fragments de thymus ou dans du milieu supplémenté en thymuline. Force est donc d'admettre que la thymuline ne stimule la prolifération des ovogonies que pendant la période comprise entre le jour de l'explantation, au 13,5<sup>e</sup> jour p. c., et le 3<sup>e</sup> jour de culture, correspondant à 16,5 jours *in utero*, stades où le taux des mitoses ovogoniales est le plus intense *in utero* [12].

Enfin, il est clair que les corticosurrénales fœtales exercent deux effets inhibiteurs sur le thymus fœtal : d'une part, sur son développement puisque l'administration d'ACTH prévient l'hypertrophie du thymus [3] qui survient après la décapitation des fœtus [2], d'autre part sur son fonctionnement puisque l'addition de corticostérone au milieu dans lequel sont cultivés les thymus empêche ceux-ci de sécréter de la thymuline. Par ailleurs, comme la décapitation de fœtus de lapin stimule la prolifération des ovogonies [1], il est

tendant de penser que, dans les conditions physiologiques normales, l'axe hypophyso-corticosurrénalo-thymique pourrait réguler la multiplication des ovogonies.

Travail effectué grâce à une subvention de la Fondation pour la Recherche médicale.

Nous remercions Jeanne Hoffbeck et Simone Perlman pour leur collaboration technique, Mireille Dardenne (I.N.S.E.R.M. U. 25, C.N.R.S. L.A. 122, Hôpital Necker, Paris) pour la qualité de ses conseils, pour nous avoir gracieusement donné de la thymopentine, enfin pour avoir recherché la présence de thymuline dans les milieux de culture, les docteurs Roxane Agelopoulou et Gilbert Meal pour avoir revu la version anglaise.

Note remise le 8 juillet 1991, acceptée après révision le 4 septembre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- J. PREPIN et A. JOST, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 313, série III, 1991, p. 81-85.
- [2] J. G. BEARN, *Anat. Rec.*, 136, 1960, p. 309-310.
- [3] J. G. BEARN, *Endocrinology*, 80, 1967, p. 979-982.
- [4] A. JOST et L. PICON, in *Advances in Metabolic Disorders*, R. LEVINE et R. LUFT éd., Academic Press, New York, 1970, p. 123-184.
- [5] J. PREPIN, C. GIBELLO-KERVAN, G. CHARPENTIER et A. JOST, *J. Reprod. Fert.*, 73, 1985, p. 579-583.
- [6] J. PREPIN, G. CHARPENTIER et A. JOST, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 300, série III, 1985, p. 43-47.
- [7] M. DARDENNE et J. F. BACH, in *Biological Activity of Thymic Hormones*, Van BERKKUM éd., Kooyer Scientific publ., Leiden, 1975, p. 235-243.
- [8] J. TIMSITT, B. SAFIEH, M. C. GAGNERAULT, W. SAVINO, J. LUBETZKI, J. F. BACH et M. DARDENNE, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 310, série III, 1990, p. 7-13.
- [9] G. GOLDSTEIN, in *Immune Regulation by Characterized Polypeptides*, Alan R. Liss, Inc., p. 51-59.
- [10] A. COHEN, *Horm. Metab. Res.*, 66, 1973, p. 66.
- [11] J. P. DUPOUY, H. COFFIGNY et S. MAGRE, *J. Endocr.*, 65, 1975, p. 347-352.
- [12] H. M. BEAUMONT et A. M. MANDL, *Proc. R. Soc. B*, 155, 1962, p. 557-579.
- [13] C. H. KEMPER et P. W. J. PETERS, *Teratology*, 36, 1987, p. 117-124.

Collège de France, Laboratoire de Physiologie du Développement,  
11, place Marcelin-Berthelot, 75231 Paris Cedex 05.





## Fibres longues ascendantes dans les colonnes dorsales d'un poisson téléostéen : une voie disynaptique reliant des organes sensoriels au cervelet

Thomas SZABO, Simone LIBOUBAN, Michèle RAVAILLE-VÉRON

**Résumé** — Contrairement à l'opinion courante selon laquelle il n'y a pas de fibres longues ascendantes proprioceptives et tactiles dans les colonnes dorsales spinales des téléostéens, l'on a pu démontrer, par des méthodes de dégénérescence et de transport axonal, la présence de telles fibres dans les colonnes dorsales du poisson téléostéen *Gnathonemus petersii*. Ces fibres prennent leur origine dans des cellules ganglionnaires spinales et sont par conséquent des fibres afférentes qui relient directement des organes sensoriels périphériques, *via* les colonnes dorsales, aux noyaux latéraux funiculaires (Fl<sub>2</sub>), lieu de terminaison des fibres des colonnes dorsales. Contrairement aux noyaux des colonnes dorsales des vertébrés supérieurs, les noyaux Fl<sub>2</sub> ne se projettent pas sur le thalamus du diencephale mais sur le lobe caudal et sur le lobe secondaire du corpus cerebelli. Les organes sensoriels sont ainsi reliés au cervelet par une voie disynaptique. Comme le lobe caudal se projette directement sur le lobe électrosensoriel, cible des afférences électrosensorielles, l'existence de la voie disynaptique chez *G. petersii* suggère un contrôle proprioceptif des afférences électrosensorielles.

### Long ascending dorsal column fibers in a teleost fish: a disynaptic pathway connecting sense organs to cerebellum

**Abstract** — In spite of the generally accepted opinion that long ascending proprioceptive and tactile fibers do not occur in the spinal dorsal columns of teleost fish, it was demonstrated with degeneration and axonal transport tracing methods that such dorsal column fibers exist in the teleost fish *Gnathonemus petersii*. These fibers are in fact common spinal afferent fibers originating in spinal ganglion cells. They connect the peripheral sense organs with the lateral funicular nuclei (Fl<sub>2</sub>) in which the dorsal column fibers terminate, directly through the dorsal columns. In contrast to the dorsal column nuclei of higher vertebrates, the Fl<sub>2</sub> nuclei do not project to the diencephalic thalamus but to the caudal lobe and the second lobe (C<sub>2</sub>) of the corpus cerebelli. Thus, sense organs and cerebellum are connected by a disynaptic pathway. Since the caudal lobe projects directly to the electrosensory lobe, that is, to the target of electrosensory afferents, the presence of a disynaptic pathway in *G. petersii* suggests the existence of a proprioceptive control of the electrosensory input.

**Abridged English Version** — INTRODUCTION. — Long ascending fiber systems carrying proprioceptive and tactile information are characteristic of the central nervous system of higher (mammalian) vertebrates. In the spinal cord of mammals there are two important, classically known, pathways: the *spinocerebellar* pathway with a *dorsal* and *ventral* component and the *dorsal column* tract. Both spinocerebellar tracts project directly from different levels of the spinal cord to the corpus cerebelli, whereas the dorsal column tracts conduct sensory information directly from the peripheral sense organs to the dorsal column nuclei, which in turn project to the diencephalic thalamus. With regard to the brain, both systems are disynaptic pathways.

Recently, Szabo *et al.* [1] reported that the spinal cord of the weakly electric teleost fish *Gnathonemus petersii* possesses a long spinocerebellar pathway directly connecting spinal segments with the cerebellar caudal lobe. In the present investigation we demonstrate in this fish the existence of a second long ascending spinal pathway which presumably carries the proprioceptive information necessary to evaluate the body configuration at each instant of electric impulse (field) emission.

Note présentée par Yves LAPORTE.

**MATERIAL AND METHODS.** — Altogether ten specimens of *Gnathonemus petersii* (Mormyridae) were used in this study: two for Fink Heimer degeneration [2] and eight for HRP tracing. Prior to surgery, the animals were anesthetized with MS222 (tricaine methansulfonate, Sandoz). The survival time was 25 days for degeneration and 2-5 days for HRP axonal transport. For the two types of experiments the animals were perfused intracardially with 4% formaldehyde or with a solution containing 2% formaldehyde and 2% glutaraldehyde made up with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The brains were cut on a freezing microtome in 25 or 40  $\mu\text{m}$  thick serial sections and the HRP was revealed according to a modified Hanker Yates method [3]. The mounted sections were counterstained with 0.1% cresyl violet.

**RESULTS.** — *Fink Heimer degeneration.* — In the 47 segment long spinal cord of *G. petersii* transections were made at the 34th segment. After a survival of 25 days a massive degeneration was observed in the dorsal columns, which extended rostrally from the section up to the spinobulbar limit. The degenerated fibers penetrated the second lateral funicular nuclei ( $\text{Fl}_2$ ) in the rostral part of which a heavy terminal degeneration could be observed. No degeneration was observed in the dorsal white matter rostrally to the  $\text{Fl}_2$  or in the dorsal column caudal to the section. In addition, degeneration occurred in the ventral as well as in the dorsal [1] parts of the lateral columns. In contrast, the ventral column was entirely degenerated caudal to the section whereas it appeared intact rostral to the section.

*HRP tracing.* — 1) After HRP application to the 30/34 spinal nerves, labeled fibers appeared in the dorsal column. Some of the dorsal root fibers coursing directly from the peripheral sense organs ascended in the dorsal column (*Fig. 1, A and G*).

2) Application of HRP to more rostral spinal nerves, e. g. first segmental or spinal occipital nerve, demonstrated that afferent fibers enter the spinal cord and run in the dorsal column to terminate in the most caudal portion of  $\text{Fl}_2$  (*Fig. 1, B and C*).

3) If a deposit of HRP was made in  $\text{Fl}_2$ , a large number of fibers were retrogradely labeled in the dorsal column (*Fig. 1, D*). In contrast, HRP injection into the dorsal white matter rostrally to  $\text{Fl}_2$  left the dorsal column unlabeled but cell bodies in  $\text{Fl}_2$  were retrogradely labeled.

Also, following HRP injections into  $\text{Fl}_2$ , labeled fibers could be traced in the dorsal white substance of the bulb. Running rostrally, these fibers divided in two tracts at the rostroventral end of the electric lobe: one tract coursed caudally on the ventral edge of the caudal lobe where it terminated; the other tract ran rostrally, and crossed the midline in the decussation of the second lobe of the corpus cerebelli in which it ended.

4) HRP injections into the caudal lobe granular layer labeled the same fiber tract as well as a large number of cell bodies in the  $\text{Fl}_2$  (*Fig. 1, F*).

**DISCUSSION.** — The present results bring clear evidence that in the teleost fish *G. petersii*, spinal afferent fibers from caudal as well as from rostral spinal segments project directly to the second lateral funicular  $\text{Fl}_2$  nuclei in the bulb. In turn, the latter form a pathway, the bulbo-cerebellar tract, which end simultaneously with their bifurcating axons in the granular layer of the caudal lobe and in the second lobe of the corpus cerebelli (*Fig. 2*). Thus, in this teleost fish, similarly to higher vertebrates, sensory information is carried directly from peripheral sense organs through the dorsal columns up to the bulbo-spinal border. However, the  $\text{Fl}_2$  nuclei of *G. petersii* project to the cerebellum and not to the thalamus as do the dorsal column nuclei in mammals. Therefore,  $\text{Fl}_2$  should rather be considered as the external cuneate nucleus which in mammals projects, as in this fish, ipsilaterally to the cerebellum [5].

The results complete earlier findings [6] according to which primary trigeminal afferents project to the first lateral funicular nuclei ([6], [7]), which in turn constitutes together with the  $Fl_2$ , the bulbocerebellar tract terminating in the caudal lobe [7].

The dorsal column fibers are not the only ascending spinal system to the cerebellum in *G. petersii*. As mentioned in the introduction, another long ascending pathway arises in the lateral spinal nucleus and connects the spinal segments directly through the lateral columns and by the intermediate lateral reticular nucleus to the cerebellar caudal lobe and to the first and second lobes of the corpus cerebelli,  $C_1$  [8] and  $C_2$ , respectively (Fig. 2).

As to the functional aspect of the system, electrophysiological experiments have demonstrated the existence of trigeminal afferent impulses which were modulated by stretch of different muscles *i.e.* muscles of the chin process [9]. In the same muscles Srivastava ([10], [11]) found sensory terminals at the tendon/muscle junctions and on the elastic cartilage of the chin process. Recently, Serrier *et al.*, [12] have recorded unit activity in the caudal lobe which appear to be influenced by both passive and active movements of the fish's body.

All these data corroborate the conclusion that *G. petersii* possesses a well developed proprioceptive system which have similar characteristics to those of higher vertebrates. This system in *G. petersii* appears to be suited to correct ambiguities in electrosensory information, due to the change in the emitted electric field configuration provoked by body movements. Such control appears to be necessary since *identical* electrosensory information may arise for two different object locations if the electric field configuration for one location is modified by a change in the relative tail (electric organ)/body position. The long ascending pathway, presently described, could carry the proprioceptive information necessary to resolve ambiguities in such electro-sensory responses.

---

INTRODUCTION. — Des voies longues ascendantes spinales conduisant des influx proprioceptifs et tactiles sont caractéristiques du système nerveux central des vertébrés supérieurs. Dans la moelle épinière des mammifères on trouve deux voies ascendantes importantes : la voie spinocérébelleuse avec ses deux composantes dorsale et ventrale et le tractus des colonnes dorsales. Les deux voies spinocérébelleuses se projettent à partir de différents niveaux spinaux directement sur le cervelet tandis que les tractus des colonnes dorsales conduisent directement des informations sensorielles périphériques aux noyaux des colonnes dorsales, qui à leur tour se projettent sur le thalamus du diencéphale. Par rapport au cerveau les deux systèmes sont des voies disynaptiques.

Récemment Szabo et coll. [1] ont montré l'existence d'une voie spinocérébelleuse longue chez le poisson téléostéen à faible décharge *G. petersii* laquelle relie directement les segments spinaux caudaux et rostraux au lobe caudal du cervelet. Dans cette étude, il est démontré que ce même poisson possède une deuxième voie ascendante spinale qui transmet vraisemblablement des informations sensorielles nécessaires à l'évaluation de la configuration du corps à chaque instant de l'émission électrique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Dix *G. petersii* ont été utilisés dans cette étude: deux pour la méthode de dégénérescence Fink Heimer [2] et huit pour le marquage par la peroxydase du Raifort (HRP). Pour les procédures chirurgicales, les animaux ont été anesthésiés par le tricaine methanosulfonate (MS222 Sandoz). La période de survie a été de 25 jours pour la dégénérescence et de 2 à 5 jours pour le transport axonal d'HRP. Les animaux ont été perfusés par voie intracardiaque, par du formaldéhyde à 4 % pour la méthode de Fink Heimer, tandis que pour le marquage à l'HRP la solution contenait 2 % de

formaldéhyde et 2 % de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4). Les cerveaux ont été débités en coupes sériées de 25 ou 40  $\mu\text{m}$  d'épaisseur à l'aide d'un microtome à congélation. L'HRP a été visualisée par une méthode modifiée de Hanker Yates [3]. Les sections montées ont été colorées par le violet de crésyl à 0,1 %.

RÉSULTATS. — *Dégénérescence de Fink Heimer.* — Pour mettre en évidence des fibres ascendantes dans la moelle épinière longue de 47 segments de *G. petersii* une transection totale a été pratiquée au 34<sup>e</sup> segment juste en avant de l'organe électrique. Après 25 jours de survie, une forte dégénérescence apparaît dans les colonnes dorsales qui s'étend rostralement de la section jusqu'à la limite spinobulbaire. Les fibres dégénérées qui pénètrent dans les seconds noyaux funiculaires latéraux ( $\text{Fl}_2$ ) se terminent massivement dans sa partie rostrale; la dégénérescence ne s'étend ni au-delà de la substance blanche dorsale du bulbe, ni dans la moelle, caudalement à la section. De plus, des fibres dégénérées apparaissent dans la partie ventrale et dorsale des colonnes latérales. En revanche, les colonnes ventrales sont complètement dégénérées caudalement à la section, tandis qu'elles sont rostralement intactes.

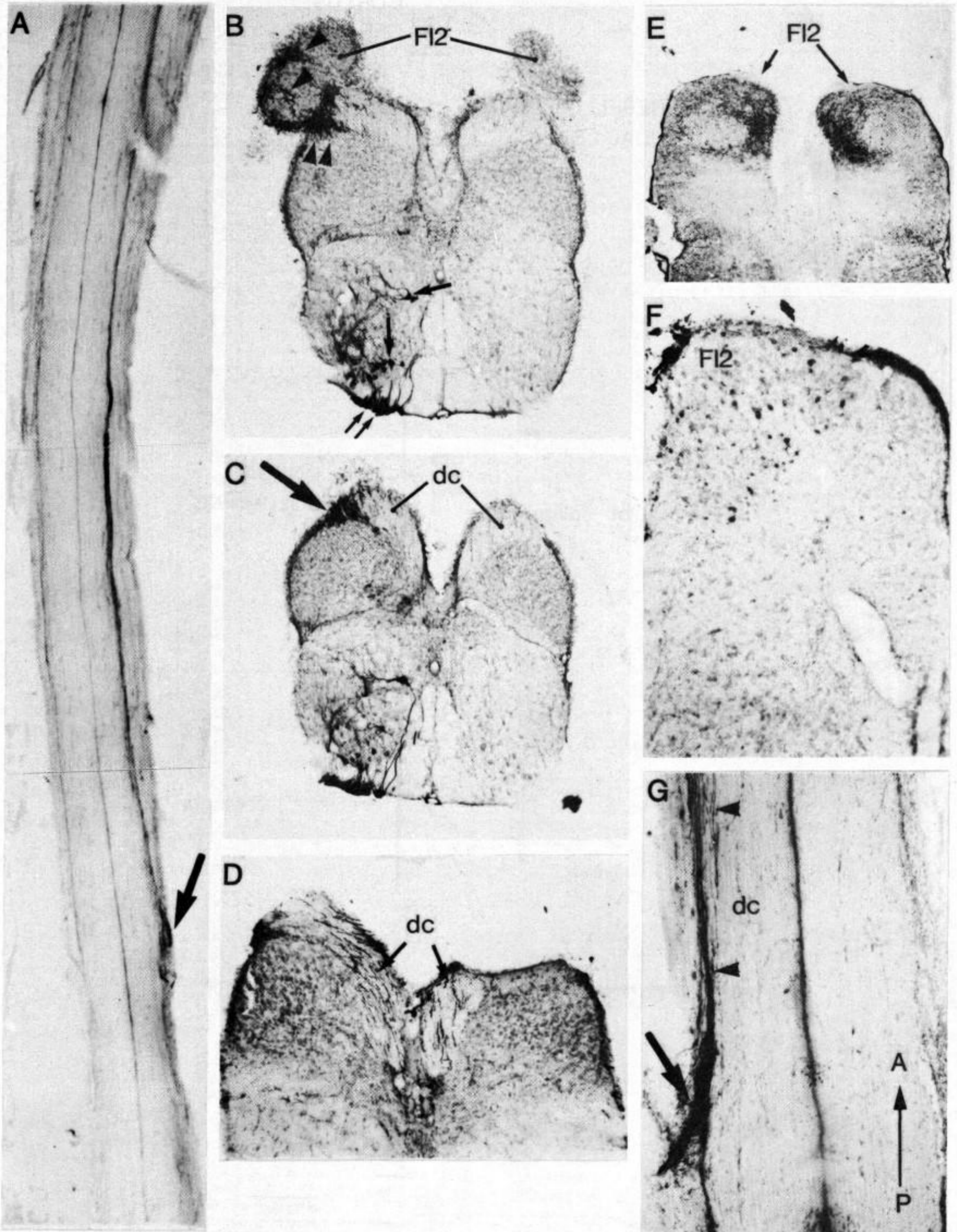
*Marquage par transport axonal.* — 1) Si des cristaux de HRP sont déposés sur les 30-34<sup>e</sup> nerfs spinaux, des fibres marquées sont observées dans la colonne dorsale ipsilatérale (fig. 1, A). Une partie des fibres des racines dorsales, c'est-à-dire des fibres afférentes primaires, peut être suivie directement dans la colonne (fig. 1, G) tandis que la majeure partie de la racine pénètre dans la corne dorsale et la substance grise centrale.

#### EXPLICATIONS DES PLANCHES

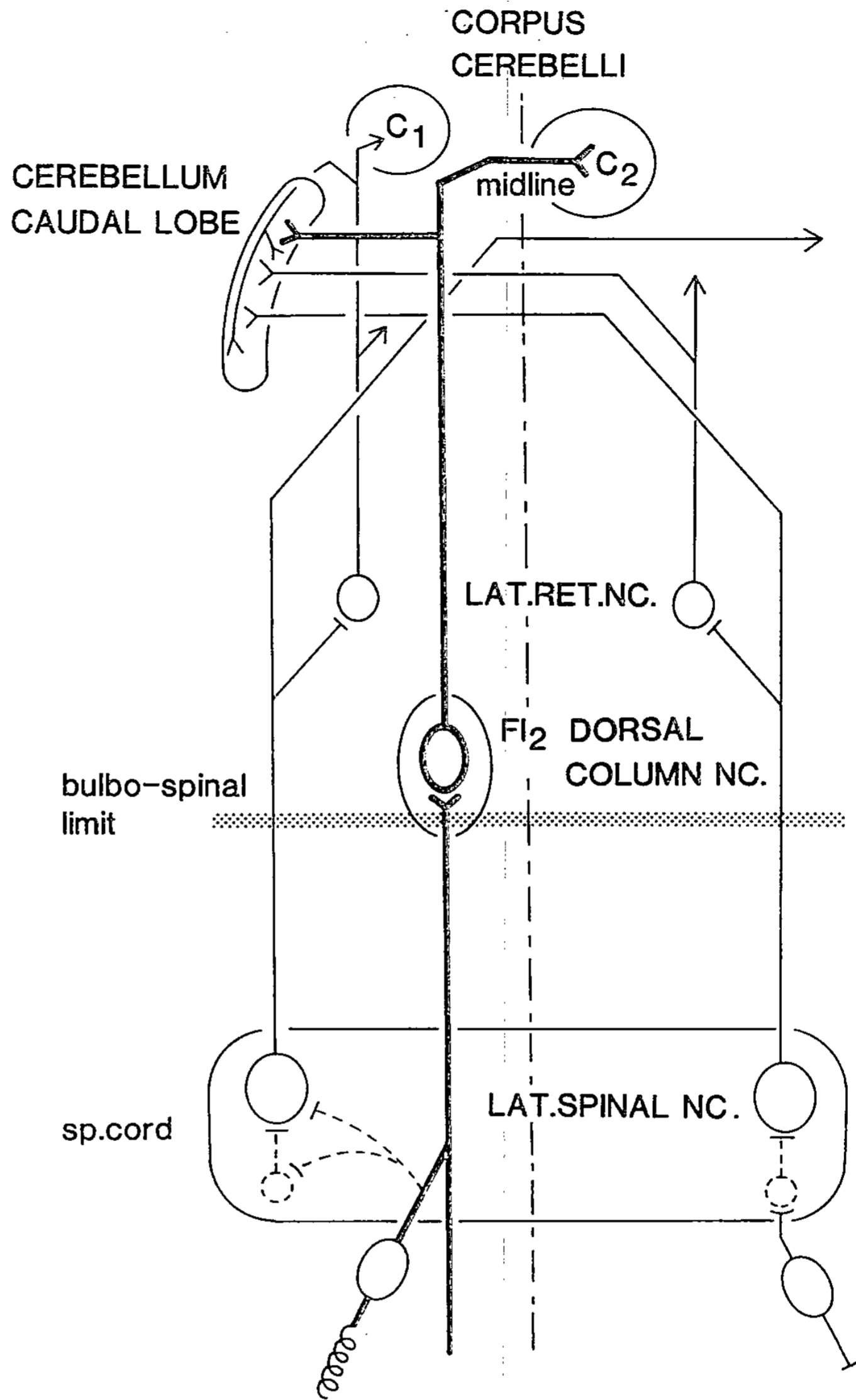
##### Planche I

Fig. 1. — A. Section longitudinale de la moelle épinière montrant des fibres ascendantes marquées dans la colonne dorsale gauche après application de peroxydase sur le 30<sup>e</sup> nerf spinal sectionné. La flèche indique la 30<sup>e</sup> racine dorsale dont les fibres marquées montent dans la colonne dorsale ipsilatérale. B. Section transversale de la moelle épinière au niveau spinobulbaire montrant des fibres marquées de la colonne dorsale pénétrant (double tête de flèche) et se terminant (tête de flèche) dans le noyau  $\text{Fl}_2$  gauche. Notez des fibres marquées de la racine ventrale (flèche double) et des motoneurons (flèche) du segment spinal correspondant. C. Fibres marquées de la racine dorsale (flèche) pénétrant dans la colonne dorsale (dc). D. Marquage rétrograde dans les deux colonnes dorsales (dc) après injection de la peroxydase dans les noyaux  $\text{Fl}_2$  symétriques. E. Dégénérescence terminale dans la partie rostrale des deux noyaux  $\text{Fl}_2$  après transection totale de la moelle épinière au 34<sup>e</sup> segment spinal. F. Marquage rétrograde des neurones du noyau  $\text{Fl}_2$  après injection de la peroxydase dans la partie postérieure granulaire du lobe caudal. G. Section longitudinale de la moelle épinière montrant des fibres de la racine dorsale pénétrant (flèche) et montant (tête de flèche) dans la colonne dorsale ipsilatérale (dc). A-P : Orientation antéro-postérieure.

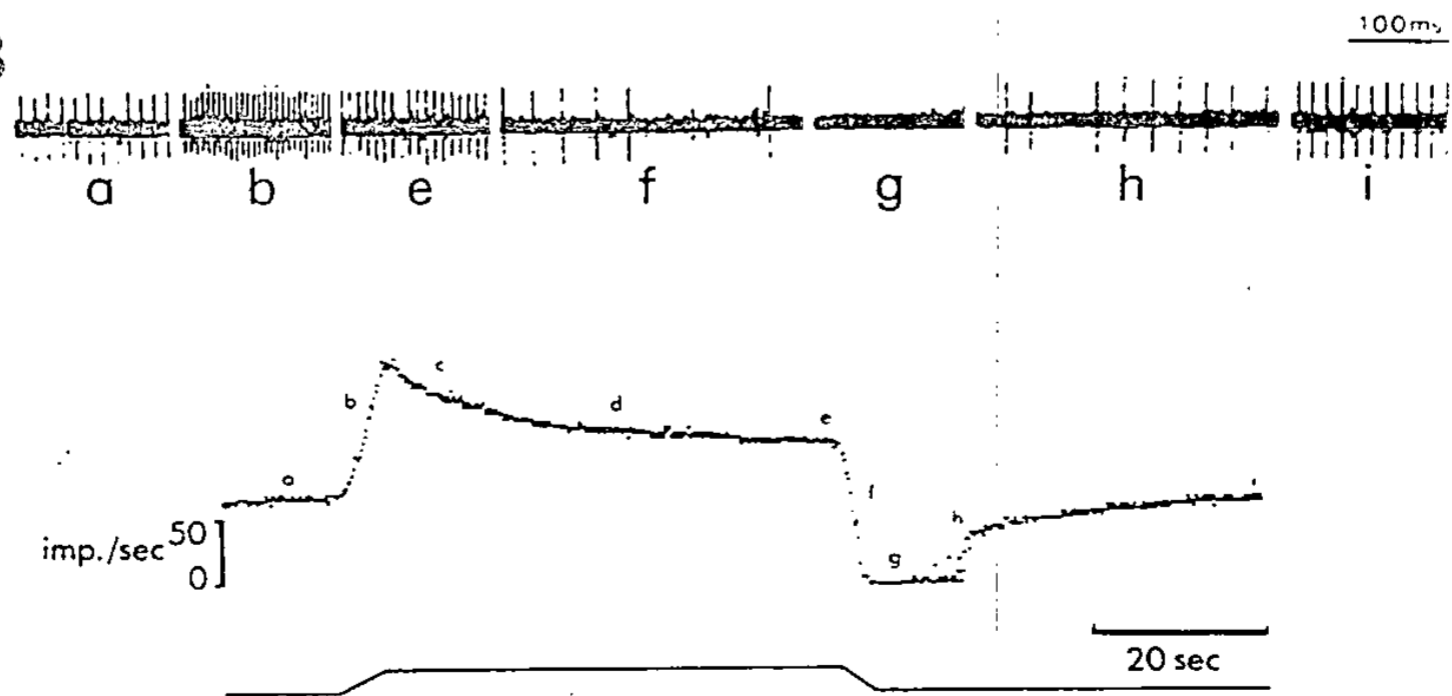
Fig. 1. — A. Longitudinal section of the spinal cord showing ascending labeled fibers in the dorsal column after HRP application to the sectioned 30th spinal nerve. Arrow points to the 30th dorsal root from which the labeled fibers arise. B. Transverse section of the spinal cord showing labeled dorsal column fibers penetrating (double arrowheads) and terminating (arrowheads) in the left  $\text{Fl}_2$  at the bulbo-spinal border. Note labeled ventral root fibers (double arrows) and motoneurons (arrow) of the corresponding spinal segment. C. Labeled dorsal root fibers (arrow) penetrating into the dorsal column. D. Retrograde labeling in both dorsal columns (dc) after HRP injection into the two symmetrical  $\text{Fl}_2$ . E. Terminal degeneration in the rostral part of both  $\text{Fl}_2$  nuclei after total spinal cord transection at the 34th segment. F. Retrogradely labeled neurons in  $\text{Fl}_2$  after HRP injection into the posterior part of the granule layer of the caudal lobe. G. Longitudinal section of the spinal cord showing labeled dorsal root fibers entering (arrow) and ascending (arrowheads) in the dorsal column (dc). A-P, antero-posterior orientation.



A



B



## Planche II

Fig. 2. — A. Dessin schématique de la voie disynaptique de la colonne dorsale (trait épais) et ses relations avec la voie spinocérébelleuse (trait fin). Les deux systèmes à fibres longues ascendantes convergent vers le lobe caudal et se projettent sur les lobes  $C_2$  et  $C_1$  [8] du corpus cerebelli. B. Enregistrement unitaire du nerf trigéminal de *G. petersii* montrant la modulation phasico-tonique de l'activité provoquée par un mouvement passif du processus mentonnier du poisson. Trace supérieure : enregistrement oscillographique d'une fibre unique ; trace intermédiaire : fréquence instantanée de l'activité unitaire ; trace inférieure : stimulation mécanique (M. H. Favarger, 1981).

Fig. 2. — A. Schematic representation of the disynaptic dorsal column pathway (heavy line) and its relation to the spinocerebellar pathway (thin line). Both are long fiber systems converging in the caudal lobe of the cerebellum and projecting to the  $C_2$  and  $C_1$  [8] corpus cerebelli. B. Single fiber recording of the trigeminal nerve showing phasic-tonic modulation in its activity by bending of the fish's chin process. Upper line: recording of a single fiber; midline: frequency variation in impulse activity during bending; lower line: mechanical stimulus (M. H. Favarger, 1981).

2) Un dépôt de HRP sur le premier nerf spinal ou nerf occipital montre que des fibres afférentes marquées entrant dans la moelle épinière cheminent dans les colonnes dorsales pour se terminer dans la partie la plus caudale du noyau  $Fl_2$  (fig. 1, B et C).

3) Après injections dans les noyaux  $Fl_2$  un grand nombre de fibres dans les colonnes dorsales sont marquées (fig. 1, D). En revanche, une injection de HRP rostralement au noyau  $Fl_2$  ne marque pas de fibres dans la colonne dorsale, mais marque d'une façon rétrograde des corps cellulaires du  $Fl_2$ .

En plus, après injection dans le  $Fl_2$ , des fibres marquées sont observées dans la substance dorsale blanche du bulbe. Ces fibres courent rostralement et se divisent en formant deux faisceaux au pôle rostroventral du lobe électrique : l'un tourne caudalement et suit le bord ventral du lobe caudal où il se termine ; l'autre court rostr dorsalement et passe dans la commissure du second lobe du corpus cerebelli du côté contralatéral où il se termine.

4) Une injection de HRP dans le lobe caudal marque ces mêmes faisceaux qui connectent le bulbe au cervelet ainsi que de nombreuses cellules dans le  $Fl_2$ .

DISCUSSION. — Ces résultats montrent que les colonnes dorsales de *G. petersii* renferment des fibres longues ascendantes qui connectent directement des organes sensoriels périphériques aux noyaux funiculaires latéraux  $Fl_2$ , c'est-à-dire aux noyaux des colonnes dorsales. Les cellules du  $Fl_2$  donnent naissance à un tractus bulbocérébelleux, qui se projette à la fois dans la couche granulaire du lobe caudal et dans le lobe secondaire du cervelet (fig. 2). Par conséquent, dans ce poisson téléostéen, comme chez les vertébrés supérieurs, les informations sensorielles sont conduites directement depuis les organes sensoriels jusqu'au niveau spino-bulbaire par les colonnes dorsales. Toutefois, les noyaux  $Fl_2$  de *G. petersii* se projettent sur le cervelet et non comme chez les vertébrés supérieurs, sur le thalamus. C'est pourquoi les noyaux  $Fl_2$  doivent être considérés comme l'homologue des noyaux cuneatus externes qui chez les mammifères se projettent sur le cervelet [5].

Ces résultats complètent des données antérieures [6] selon lesquelles les afférences primaires trigéminales, les équivalents du système afférent spinal, se projettent dans les premiers noyaux funiculaires latéraux  $Fl_1$  ([6], [7]) qui forment ensemble avec les seconds noyaux funiculaires latéraux  $Fl_2$ , le tractus bulbocérébelleux qui se termine dans le lobe caudal du cervelet [7].

La voie des colonnes dorsales n'est pas le seul système ascendant vers le cervelet présent chez *G. petersii*. Comme cela a été évoqué dans l'introduction, un autre système



de fibres longues ascendantes existe dans les colonnes latérales. Celui-ci relie les différents segments de la moelle épinière directement ou par le noyau réticulé latéral bulbaire aux lobes C<sub>1</sub> [8] et C<sub>2</sub> du cervelet (*fig. 2*), et converge, à ce niveau, avec les fibres des colonnes dorsales.

Considérant les aspects fonctionnels de ce système, il a été démontré qu'il existe dans le nerf trigéminal des fibres afférentes qui conduisent des impulsions sensorielles dont l'activité est modulée par les mouvements passifs, c'est-à-dire des étirements des muscles du processus mentonnier [9]. Dans ces mêmes muscles Srivastava ([10], [11]) a pu identifier des terminaisons sensorielles à la jonction musculo-tendineuse et sur la surface cartilagineuse du processus mentonnier. Récemment, Serrier et coll. [12] ont détecté des activités unitaires dans le lobe caudal qui sont modulées par des mouvements passifs et actifs du corps du poisson.

Toutes ces données permettent de conclure que *G. petersii* possède un système proprioceptif similaire à celui des vertébrés supérieurs. Ce système pourrait servir à éviter les ambiguïtés dans le système d'électrolocation dues aux changements provoqués par les mouvements du corps dans la configuration du champ électrique émis. De tels contrôles sont effectivement nécessaires, car des informations sensorielles peuvent être identiques pour deux positions différentes d'un objet si la configuration du champ électrique pour une des positions est modifiée par un changement d'orientation du pédoncule caudal (qui renferme l'organe électrique) par rapport au corps. Les voies longues ascendantes pourraient fournir les informations proprioceptives et/ou tactiles destinées à clarifier les ambiguïtés dans de telles réponses électrosensorielles.

Note remise le 5 août 1991, acceptée le 28 août 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] T. SZABO, S. LIBOUBAN et J.-P. DENIZOT, *Arch. Ital. Biol.*, 128, 1990, p. 229-247.
- [2] R. P. FINK et L. HEIMER, *Brain Res.*, 4, 1967, p. 369-374.
- [3] C. C. BELL, T. E. FINGER et C. J. RUSSEL, *Exp. Brain Res.*, 42, 1981, p. 9-22.
- [4] T. SZABO et S. LIBOUBAN, *Neurosci. Abstr.*, 13, 1987, p. 132.
- [5] O. OSCARSSON, In *Hdb. Sensory Physiol.*, II, 1987, p. 339-380.
- [6] L. MALER, *J. Comp. Neurol.*, 151, 1973, p. 67-84.
- [7] S. LIBOUBAN et T. SZABO, *Neurosci. Lett.*, 6, 1977, p. 115-119.
- [8] J. MEEK, R. NIEUWENHUYS et D. ELSEVIER, *J. comp. Neurol.*, 245, 1986, p. 319-341.
- [9] M. H. FAVERGER, La proprioception chez un Téléostéen (Mormyridae) avec une Note sur les effets neurophysiologiques d'un anesthésique (MS222). *Thèse de 3<sup>e</sup> cycle*, Paris, 1981, p. 111.
- [10] C. B. L. SRIVASTAVA, *Arch. Anat. Microsc. Morphol. exp.*, 66, 1978, p. 253-261.
- [11] C. B. L. SRIVASTAVA, *Nat. Acad. Sci. Letters*, 2, 1979, p. 199-202.
- [12] J. SERRIER, A. KLEISER et K. GRANT, *Neurosci. Abstr.*, 17, 1991.

Département de Neurophysiologie sensorielle,  
Laboratoire de Physiologie nerveuse, C.N.R.S., 91198 Gif-sur-Yvette Cedex.

## Implication du système glutamatergique de l'amygdale au cours des crises généralisées provoquées par le soman : comparaison avec l'hippocampe

Guy LALLEMENT, Pierre CARPENTIER, Agnès COLLET, Irmine PERNOT-MARINO, Dominique BAUBICHON, Henri SENTENAC-ROUMANOU et Guy BLANCHET

**Résumé** — La mesure par microdialyse intra-amygdalienne du taux extracellulaire du glutamate montre une augmentation rapide et soutenue de ce neurotransmetteur au cours des crises généralisées provoquées par un composé organophosphoré inhibiteur irréversible de l'acétylcholinestérase, le soman. L'élévation du taux de glutamate est plus rapide que celle que nous avons observé dans l'hippocampe lors d'une étude précédente. Un tel fait suggère que lors d'une intoxication par le soman, l'amygdale est impliquée précocement dans le déclenchement de l'état convulsif. D'autre part, l'étude *ex vivo*, par autoradiographie quantitative, de la liaison de la TCP (thiényl-phencyclidine) tritiée dans l'amygdale, ne révèle pas d'ouverture des canaux ioniques liés aux récepteurs du glutamate sensibles au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) au cours des crises généralisées. Nous avons observé un phénomène inverse dans l'hippocampe. Cette différence pourrait indiquer que la libération du glutamate s'effectue dans l'amygdale de manière massive et non sous forme de stimuli répétés comme dans l'hippocampe.

### Involvement of glutamatergic system in amygdala during soman-induced seizures: comparison with hippocampus

**Abstract** — During seizures induced by soman, an organophosphorus compound, irreversible inhibitor of acetylcholinesterase, the intra-amygdaloid microdialysis of extracellular glutamate, an excitatory amino-acid, showed a sustained increase, more rapid than in hippocampus. This result suggests an early involvement of the amygdala in the development of soman-induced seizures. Moreover, the *ex vivo*, study by quantitative autoradiography of the binding of tritiated TCP (thienyl-phencyclidine) does not reveal an opening of ionic channels linked to N-methyl-D-aspartate (NMDA) sensitive receptors of glutamate, during seizures, unlike in the hippocampus. This difference could indicate, according to other experimental models, that in amygdala the release of glutamate could occur massively without repeated stimuli as in the hippocampus.

**Abridged English Version** — The involvement of the glutamatergic system in the development of soman-induced seizures was established in hippocampus in previous studies ([1], [2]). This confirmed the hypothesis that non-cholinergic mechanisms may participate in the series of events which follow the administration of anticholinesterase nerve agents [5]. The activation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subtypes plays a key role during these phenomena [1]. The aim of this study was to determine if the glutamatergic system was involved in another epileptogenic area, the amygdala ([6], [7], [8]), and to specify its mechanism. The glutamate level was measured by microdialysis during soman-induced seizures and the activation of NMDA receptors was observed by the binding of [<sup>3</sup>H]TCP (N-(1-2[thienyl]cyclohexyl) piperidine) a selective ligand for the ionic channel associated to NMDA receptors.

**MATERIAL AND METHODS.** — Extracellular glutamate levels were measured in amygdala on freely moving rats. 4 days before dialysis, a guide probe was implanted according to the following coordinates [15] A: -2.8; L = 5; V = -7.8 mm. The probe (240 μm diameter, membrane length 1 mm) was then perfused with normal saline 0.9% (w/v). The perfusate

Note présentée par Robert NAQUET.

samples are collected at 10 min. intervals. After baseline establishment (1 hr.), animals were given 0.9 LD<sub>50</sub> soman (90 µg/kg; s. c.). Amino acids were measured according to the method of Durkin [16].

The analysis of NMDA-receptor activation was performed on brain slices obtained from poisoned rats (1 LD<sub>50</sub> of soman). The animals were decapitated after 10 or 40 min. of seizures ( $n=6$  for each time). The brains were quickly removed and frozen in isopentane ( $-35^{\circ}\text{C}$ ). Slices (15 µm thick) including amygdala (levels 19 to 21 of Paxinos and Watson's atlas [15]) were cut on a cryostat and thaw-mounted on gelatin-coated slides. The ionic channel associated to the NMDA receptor was identified according to Maragos *et al.* [14] using a non-competitive antagonist of the receptor: [<sup>3</sup>H]TCP (45 Ci/mmol) at 20 nM [13].

RESULTS. DISCUSSION. — The basal level of glutamate was  $3.62 \pm 1.44 \times 10^{-7}$  M (Fig. 1) ( $m \pm \text{SEM}$ ;  $n=8$ ). The concentration increased as early as the pre-seizures period and remained sustained throughout the experiment. This finding, compared with hippocampus, where no increase was observed during the pre-seizure period, proved that the amygdala was involved earlier than the hippocampus in development of soman-induced seizures [5]. Moreover, because of the projection arising from amygdala to the hippocampus [9], the primary amygdaloid activation could lead to a secondary activation of hippocampal neurons [7]. The sustained release of glutamate observed in amygdala during seizures was not found in hippocampus. A transient and rapid increase of glutamate occurred in CA<sub>3</sub> within 30 min. of seizures; in CA<sub>1</sub> a two-phase variation was observed. These changes correlated with an increase in hippocampal glutamate uptake. The persistence of a sustained release in the amygdala could reflect a lack of compensatory uptake mechanism in this area.

On the other hand, the binding of [<sup>3</sup>H]TCP does not reveal an opening of ionic channels linked to NMDA-receptors during severe seizures in the amygdala. An opposite result was found in hippocampus with a progressive activation of NMDA-receptors [1]. Thus, although the extracellular levels of glutamate were similarly increased in both the amygdala and the hippocampus, there is a difference in the activation of NMDA-receptors. This discrepancy could reflect a difference in the release of glutamate as suggested by the study of long-term potentiation [17]. When the glutamate is released by high-frequency pulses, it leads to the activation of NMDA-receptors. On the contrary, when the glutamate is released massively during low-frequency stimulation it acts only on non-NMDA-receptors.

---

INTRODUCTION. — Les acides aminés neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique jouent un rôle important dans le fonctionnement du système nerveux central. Libérés de manière excessive, ils peuvent être impliqués dans l'initiation ou la propagation des crises épileptiques généralisées. Lors d'études précédentes, nous avons démontré que le système glutamatergique de l'hippocampe est impliqué dans les phases d'initiation et de maintien des crises épileptiques provoquées par un neurotoxique organophosphoré inhibiteur irréversible de l'acétylcholinestérases (AChE), le soman ([1], [2]). Les récepteurs du glutamate, plus particulièrement ceux sensibles au N-méthyl-D-aspartate (NMDA), sont activés durant ces phénomènes [1]. L'effet protecteur d'une injection systémique de certains antagonistes des récepteurs au NMDA dans plusieurs modèles expérimentaux reproduisant des crises épileptiques vient à l'appui de ces résultats ([3], [4]). Les crises observées ne seraient donc pas liées au seul phénomène d'inhibition de l'AChE et à l'accumulation d'acétylcholine (ACh) qui en résulte [5].

Le but de cette étude est de déterminer si, lors d'une intoxication par le soman, des effets semblables sont observés dans une autre zone épileptogène du cerveau : l'amygdale ([6], [7], [8]). Cette structure possède des connexions bilatérales afférentes et efférentes avec l'hippocampe [9]. Par ailleurs, il s'agit d'une région où les altérations neuropathologiques dues au soman sont très importantes ([5], [10], [11], [12]).

C'est pourquoi, nous avons étudié les variations du taux extracellulaire du glutamate dans le noyau basolatéral de l'amygdale par microdialyse intracérébrale au fur et à mesure du développement des crises généralisées. En outre, l'ouverture du canal ionique lié aux récepteurs au NMDA a été mesurée grâce à la liaison de [ $^3\text{H}$ ]TCP (N-(1-[2 thiényl] cyclohexyl) pipéridine), ligand sélectif d'un site « phencyclidine » localisé à l'intérieur de ce canal ([13], [14]).

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — *Mesure du taux extracellulaire du glutamate.* — Les mesures par microdialyse intracérébrale ont été effectuées sur des rats non anesthésiés, sans contention. 4 jours avant la dialyse un guide de sonde est implanté chez l'animal selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes [15] A = -2,8; L = 5; V = -7,8 mm. Une sonde de microdialyse est placée le jour de l'expérimentation (diamètre 240  $\mu\text{m}$ , membrane dialysante = 1 mm), puis est perfusée avec du sérum physiologique à 2  $\mu\text{l}/\text{mn}$ , les dialysats sont recueillis toutes les 10 mn. Après obtention d'une ligne de base (1 h de perfusion), les animaux ( $n=8$ ) sont intoxiqués avec 1  $\text{DL}_{50}$  de soman (90  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; s. c.), les dialysats sont recueillis pendant 2 h, les signes cliniques d'apparition des crises sont notés. L'analyse des acides aminés dans les dialysats (20  $\mu\text{l}$ ) est conduite selon la technique de Durkin [16] à savoir, dérivatisation par l'orthophtaldialdéhyde, puis analyse par HPLC (Colonne C8; 5  $\mu\text{m}$  Hypersil: SFCC France) en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile (10 à 17 % vol/vol) dans un tampon d'acétate de sodium (0,02 M, pH 6,2) et détection par fluorimétrie. La limite de détection du glutamate est voisine de  $5 \cdot 10^{-9}$  M. Les valeurs mesurées sont comparées au taux de base par analyse de variance avec mesures répétées suivies de tests  $t$  de Dunnett.

*Autoradiographie quantitative.* — L'analyse *ex vivo* des récepteurs du glutamate, sensible au NMDA a été réalisée, sur coupes d'amygdale obtenues à partir de rats intoxiqués par 1  $\text{DL}_{50}$  de soman (90  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; s. c.). Les animaux présentant la symptomatologie de l'empoisonnement par le soman et des crises convulsives depuis 10 ou 40 mn étaient retenus ( $n=6$  pour chaque temps). Un lot témoin ( $n=6$ ) est constitué d'animaux sacrifiés 30 mn après injection de sérum physiologique.

Après décapitation, les cerveaux sont prélevés et congelés rapidement à  $-35^\circ\text{C}$  dans l'isopentane. Les coupes de 15  $\mu\text{m}$  d'épaisseur incluant l'amygdale (niveau 19 à 21 de l'Atlas Paxinos et Watson [15]) sont réalisées sur cryostat et recueillies sur lames gélatinées.

Le canal ionique associé au récepteur du NMDA a été identifié selon la technique de Maragos et coll. [14] grâce à un antagoniste non compétitif de ce récepteur : la TCP tritiée (45 Ci/mmol, Amersham, Les Ulis, France) à la concentration de 20 nM (tampon Tris HCl 50 mM, pH 7,4).

Après 45 mn d'incubation à  $22^\circ\text{C}$ , les coupes sont lavées, séchées puis placées en contact durant 28 jours à  $4^\circ\text{C}$  avec un film Amersham Hyperfilm 3 H. Des échelles standards de radioactivité (Amersham) sont apposées sur le film en même temps. La densité optique du film lue au niveau de l'amygdale est convertie en femtomoles de ligand fixées par milligramme de protéines à l'aide des étalons de radioactivité connue, et en tenant compte de l'activité spécifique du ligand. La fixation non spécifique est définie en

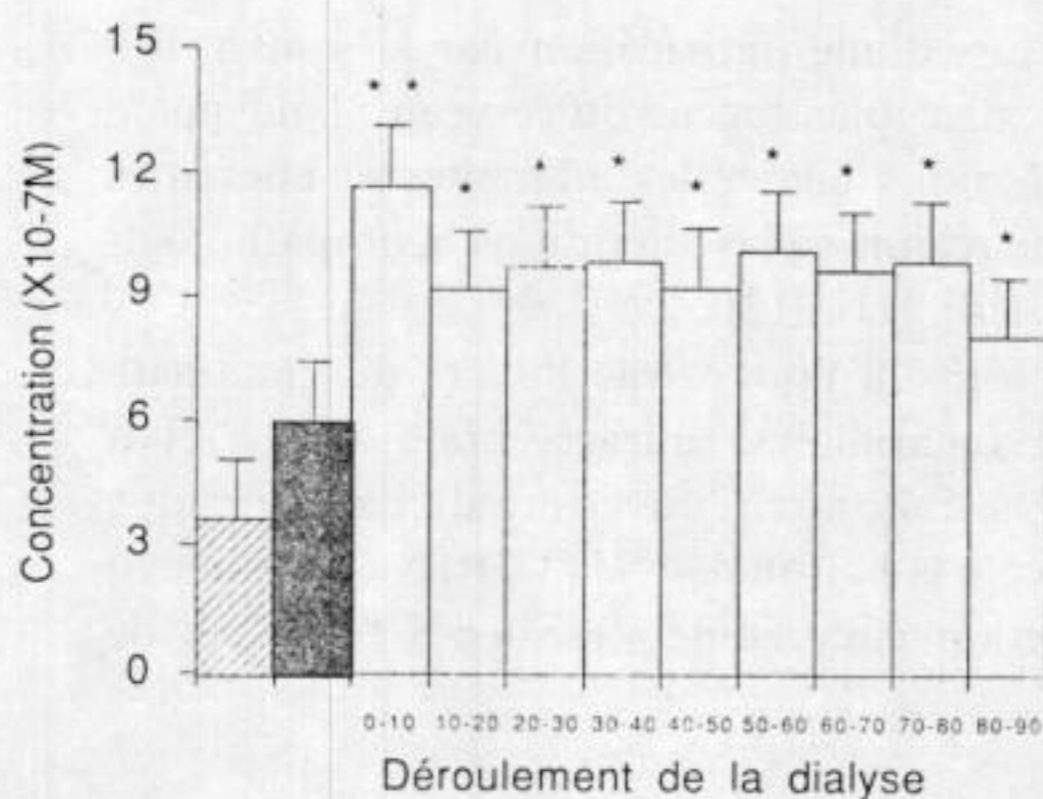


Fig. 1

Fig. 1. — Concentration extracellulaire du glutamate dans l'amygdale au cours des crises provoquées par le soman. ▨, Taux de base. ■, Période de pré-crisis. ▩, Période de crises : durée de crises exprimée en minutes. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  ESM ( $n=8$ ). Comparaison statistique par rapport au taux de base par analyse de variance avec mesures répétées suivie de test  $t$  de Dunnett. \*\* $p<0,01$ ; \* $p<0,05$ .

Fig. 1. — Extracellular glutamate level in amygdala during soman-induced seizures. ▨, Basal level. ■, Pre-seizure period. ▩, Seizure period: duration of seizures expressed in minutes. Values given are means  $\pm$  SEM ( $n=8$ ). Statistical comparison with basal level performed by variance analysis with repeated measurements followed by Dunnett's  $t$  test. \*\* $p<0.01$ ; \* $p<0.05$ .

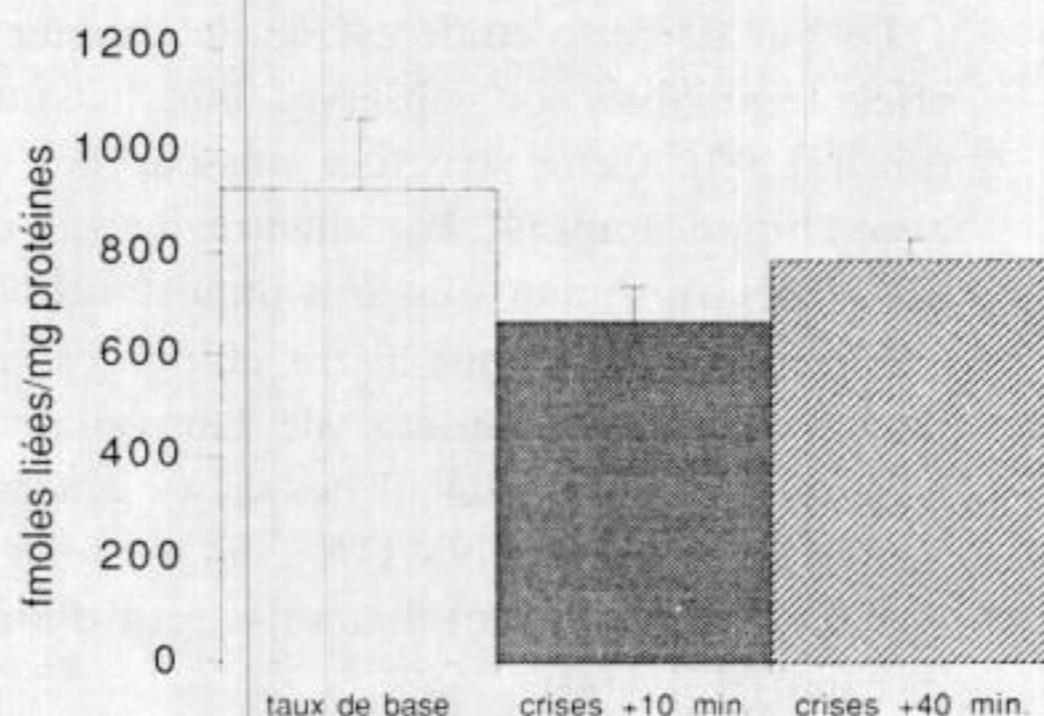


Fig. 2

Fig. 2. — Liaison de la [<sup>3</sup>H]TCP dans le canal ionique lié au récepteur du glutamate sensible au NMDA dans l'amygdale au cours des crises provoquées par le soman. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  ESM ( $n=6$  pour chaque valeur). Comparaison statistique par rapport au témoin effectué par test non paramétrique U de Mann-Whitney.

Fig. 2. — Binding of [<sup>3</sup>H]TCP in the ionic channel associated with NMDA glutamate receptor subtype in the amygdala soman-induced seizures. Values given are means  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Statistical comparison performed by non-parametric U test of Mann-Whitney.

présence de TCP non marquée ( $10^{-6}$  M). La comparaison statistique des résultats par rapport au lot témoin est effectuée par le test non paramétrique U de Mann-Whitney.

RÉSULTATS. — Taux extracellulaire du glutamate (fig. 1). — Le taux de base du glutamate est de  $3,62 \pm 1,44 \cdot 10^{-7}$  M ( $m \pm$  ESM;  $n=8$ ).

Après l'injection du toxique et au cours de la période précédant les crises (durée moyenne = 13,5 mn), le taux de glutamate augmente mais de manière non significative. Toutefois, chez les animaux ayant présenté une période de latence voisine de 20 mn ( $n=5$ ), le taux de glutamate augmente significativement pour atteindre un maximum de +94 % par rapport au niveau de base. Après le début des crises généralisées, nous observons une très forte augmentation du taux extracellulaire (+223 % dans le premier dialysat recueilli). Le taux reste ensuite élevé durant toute la période de crises (+170 % en moyenne par rapport au niveau de base).

Ouverture des canaux ioniques liés aux récepteurs au NMDA (fig. 2). — *Ex vivo*, la liaison de la TCP tritiée n'est pas modifiée de manière significative durant le développement des crises convulsives (fixation témoin :  $925 \pm 138$  fmoles/mg protéines;  $m \pm$  ESM;  $n=6$ ).

DISCUSSION. — L'augmentation rapide du taux extracellulaire du glutamate dans l'amygdale, durant la période précédant les crises convulsives provoquées par le soman,

traduit vraisemblablement une hyperexcitation précoce des neurones glutamatergiques. Dans un travail précédent, les mesures effectuées au niveau des aires CA<sub>3</sub> et CA<sub>1</sub> de l'hippocampe n'avaient indiqué aucune augmentation de la libération de ce neurotransmetteur, pendant la même période [2]. L'amygdale pourrait donc être une des zones impliquées dans l'initiation des crises dues au soman comme cela a été suggéré par McDonough et coll. [5]. L'activation de l'amygdale pourrait ensuite se propager, grâce à des trajets afférents [9], vers l'hippocampe [7].

Durant les crises convulsives, l'augmentation relative du taux de glutamate est comparable dans l'amygdale et dans l'hippocampe (respectivement +223 et +180 % au maximum). Toutefois la cinétique de la libération de ce neurotransmetteur est différente dans les deux structures. Dans l'aire CA<sub>3</sub> de l'hippocampe l'augmentation ne persiste que durant les 30 premières minutes de crises. En CA<sub>1</sub> nous avons observé une variation en deux temps, à savoir une première augmentation suivie d'une diminution après 30 mn de crises puis une seconde augmentation plus soutenue [2]. Nous avons montré que ces variations correspondent à une modification de la vitesse de recapture du glutamate par les cellules gliales ou neuronales de l'hippocampe. La persistance dans l'amygdale d'un taux extracellulaire élevé pourrait refléter une altération, sous l'effet du soman, d'un tel système compensateur de recapture.

L'étude de la liaison de la TCP tritiée sur des coupes d'amygdale ne révèle pas d'ouverture significative des canaux ioniques liés aux récepteurs au NMDA au fur et à mesure que les crises généralisées se développent. Par contre, dans l'aire CA<sub>1</sub> de l'hippocampe, la persistance des crises aboutit à une ouverture progressive de ces canaux objectivée par une fixation accrue de TCP après 40 mn de crises [1]. L'augmentation similaire du taux extracellulaire de glutamate dans les deux régions ne permet pas d'expliquer la différence de réponse des récepteurs au NMDA. Toutefois, cette dernière pourrait être liée à une différence dans le mode de libération du neurotransmetteur. En effet, des études électrophysiologiques réalisées lors de l'initiation du phénomène de potentialisation à long terme (PLT) [17] montre qu'une libération soutenue et répétitive de glutamate, suite à une stimulation synaptique de haute fréquence, aboutit à l'activation des récepteurs NMDA. Par contre, lorsque le glutamate est libéré de manière exagérée par une stimulation de basse fréquence, il n'agit que sur les récepteurs non NMDA. Seules des études similaires réalisées au niveau de l'amygdale et de l'hippocampe permettront de connaître précisément le rôle du glutamate dans le déclenchement des crises convulsives provoquées par le soman.

Cette étude a été financée par le contrat DRET 90/1009 J.

Note remise le 16 septembre 1991, acceptée le 19 septembre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] G. LALLEMENT, P. CARPENTIER, I. PERNOT-MARINO, D. BAUBICHON, A. COLLET et G. BLANCHET, *Neurotoxicology*, 4, 1991 (à paraître).

[2] G. LALLEMENT, P. CARPENTIER, A. COLLET, I. PERNOT-MARINO, D. BAUBICHON et G. BLANCHET, *Brain Research* (à paraître).

[3] G. C. ORMANDY, R. S. JOPE et O. C. SEAD, *Exp. Neurol.*, 106, 1989, p. 172-180.

[4] D. J. BRAITMAN et S. SPARENBORG, *Brain Res. Bull.*, 23, 1989, p. 145-148.

[5] J. H. McDONOUGH, C. G. MCLEOD et M. T. NIPWODA, *Brain Research*, 435, 1987, p. 123-137.

[6] S. P. GROSSMAN, *Science*, 143, 1963, p. 409-411.

[7] J. W. OLNEY, T. DEGUBAREFF et J. LABRUYÈRE, *Nature*, 301, 1983, p. 520-522.

- [8] C. G. WASTERLAIN, A. M. MORIN et V. JONEC, *Brain Research*, 247, 1982, p. 341-346.
- [9] W. K. SCHWERDTFEGER in F. BECK et W. HILD éd., *Structure and fiber connections of the hippocampus*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984.
- [10] G. LEMERCIER, P. CARPENTIER, H. SENTENAC-ROUMANOU et P. MORELIS, *Acta Neuropathol.*, 61, 1983, p. 123-129.
- [11] C. G. MCLEOD, A. W. SINGER et D. G. HARRINGTON, *Neurotoxicology*, 5, 1984, p. 53-58.
- [12] L. CHURCHILL, T. L. PAZDERNIK, J. JACKSON, S. R. NELSON, F. E. SAMSON, J. H. McDONOUGH et C. G. MCLEOD, *Neurotoxicology*, 6, 1985, p. 81-90.
- [13] J. A. KEMP, A. C. FOSTER et E. H. F. WONG, *Trends Neurosci.*, 10, 1987, p. 294-298.
- [14] W. F. MARAGOS, J. B. PENNEY et A. B. YOUNG, *J. Neurosci.*, 8, 1988, p. 493-501.
- [15] G. PAXINOS et C. WATSON, Academic Press Inc., New York, 1982.
- [16] T. A. DURKIN, *J. Chromato*, 428, 1988, p. 9-15.
- [17] G. L. COLLINGRIDGE et T. V. P. BLISS, *Trends Neurosci.*, 10, 1987, p. 288-293.

---

C.R.S.S.A., Unité de Neurotoxicologie,  
24, avenue du Maquis-du-Grésivaudan, B.P. n° 87, 38702 La Tronche Cedex.

## Latéralisation chez le chat dans une tâche de pointage du membre antérieur en direction d'une cible mobile

Michèle FABRE-THORPE, Joël FAGOT et Jacques VAUCLAIR

**Résumé** – La latéralisation de 44 chats a été analysée dans la réalisation d'un geste de pointage effectué en direction d'une cible mobile. Plus de 50 % des animaux ( $n=23$ ) se sont révélés très fortement latéralisés; ils utilisaient un de leurs membres antérieurs pour exécuter plus de 90 % du total des tentatives effectuées. Parmi ces sujets latéralisés, les gauchers étaient significativement plus nombreux ( $n=17$ ) que les droitiers ( $n=6$ ). L'analyse des performances visuo-motrices a montré que, à précision égale, les animaux latéralisés déclenchaient plus rapidement leur mouvement de pointage que les animaux sans préférence. Pour l'ensemble des 44 sujets, la comparaison des performances des deux groupes de chats n'a pas fait apparaître de différence en ce qui concerne la durée de l'exécution du mouvement. En revanche la patte la plus utilisée était plus précise et plus rapide à déclencher et à exécuter le mouvement que la patte la moins utilisée. Cette étude montre, chez le chat, une asymétrie de préférence associée à une asymétrie de performance.

### Cats paw preference in pointing towards a moving target

**Abstract** – In a group of 44 cats overtrained on a task where they had to reach for a moving target, paw performance and paw preference were investigated. More than half of the cats ( $n=23$ ) were strongly lateralized in that they used one of their paws to perform more than 90% of the reaching attempts. Among these lateralized cats, left-pawed ones ( $n=17$ ) significantly exceeded right pawed-animals ( $n=6$ ). Investigating both the accuracy and speed scores, the comparison between lateralized and non-lateralized cats (using a criterion of 90% lateralization) showed that although the accuracy scores did not differ, lateralized cats were significantly quicker to trigger their movement. No difference was found concerning the movement time. For the whole group of 44 cats the comparison between the performance levels obtained with their two forepaws showed that the more frequently used paw was significantly more accurate and faster to trigger and to execute the movement than the less used paw. This study shows that, in pointing towards a moving target, cats display an asymmetry in paw preference that is associated with a performance asymmetry.

**Abridged English Version** – Whereas in man, the existence of a functional asymmetry between the two cerebral hemispheres is well established, studies investigating such asymmetries in animals have only developed since the sixties. Although this question has been addressed with various species such as parrots [1], mice ([2], [3]), and cats [4], the problem has usually been tackled in subhuman primates, and in general the results have been controversial ([5], [6], [7]). In monkeys and apes, a left hand bias was found in visuo-spatial tasks ([8], [9]). That left hand preference could reflect the specialization of the right hemisphere in spatial processing. To investigate whether non primate mammals could also display some forelimb lateralization, we studied the paw preference of 44 cats trained to perform a pointing movement towards a moving target. Cats are good candidates for such a study since, as natural predators, they catch moving preys with their forelimbs. However, only a few studies are available on lateralization in this species and in none of them was the visuo-motor performance of each paw analysed and compared ([13] to [16]).

In the task, cats were facing a tilted screen, and each trial started with a sound; the animal had then to keep still with each of its forepaws placed on a "starting plate". After a variable delay a spot appeared anywhere on the screen, moving quasi-randomly. The cat had to reach for it to be rewarded and, in the present study, its two first reaching attempts were taken into consideration. The animal was free to use any forepaw. The starting plates allowed the used paw to be automatically recorded and the delay between the onset of the

Note présentée par Pierre BUSER.



target and the paw lift (*i.e.* the reaction time: RT) to be determined. A proximity detector could record the paw contact with the target on an accurate movement. The delay from the paw lift to the contact with the target (movement time: MT) was also recorded. After overtraining (60 trials a day, 5 days a week, for up to 6 months) the cat's visuo-motor scores were recorded. For each attempt the chosen paw (left or right) and its outcome (whether accurate or not) were recorded.

We have analyzed a total of 23,422 trials performed by the 44 cats. For 16,307 trials (69.6%) the first attempt correctly reached the target, the other trials involved the execution of two attempts. The total number of attempts (30,537), whether accurate or not, was used to assess the cat's lateralization. For the whole group, 55.6% of the attempts were performed by the left paw; thus the right paw was used in 44.4% of the attempts. The difference is not significant. On the other hand, an asymmetry was observed in the repartition of the 44 cats when considering the percentage of left paw usage (*Fig. 2*). Using a 50% criterion, half of the subjects were left-pawed ( $n=22$ ) and half were right-pawed ( $n=22$ ). However, with a criterion of 90%, 17 cats were left-pawed, only 6 were right-pawed, the remaining 21 were without preference. Among the 23 lateralized cats, left-pawed subjects significantly outnumbered the right-pawed ones (two tailed chi square,  $p < .02$ ).

The analyses of accuracy performance and speed of movement execution (RT and MT) were also done for all cats and for each paw. An accuracy ratio (varying from 0 to 1) corresponding to the total number of accurate attempts divided by the overall number of attempts was established. A comparison between the group of lateralized cats (criterion 90%) and the group of cats displaying no preference showed no significant difference for accuracy. On the other hand, the lateralized cats (mean RT=234 ms) were significantly faster to initiate their movements than the ambidextrous ones (mean RT=283 ms; two tailed  $t$  test,  $p < 0.05$ ). No difference was found when comparing MT. A comparison of performance levels showed no difference for accuracy, RT or MT, between the left and the right paws. On the other hand, it was found that the more frequently used paw was significantly more accurate (two tailed Wilcoxon T Test,  $p < .02$ ), had a shorter RT (270 ms versus 290 ms, two tailed paired  $t$ -test,  $p < .02$ ) and a shorter MT (266 ms versus 285 ms, two tailed paired  $t$ -test,  $p < .05$ ) than the less used one. This study has shown that, in pointing towards a moving target, cats can be strongly lateralized. Among these animals, left-pawed cats outnumbered significantly right-pawed ones. The results have also shown a coherence between paw preference and paw performance since the more frequently used paw is both more accurate and faster to trigger and to execute the pointing movement. It is suggested that the motor lateralization shown by the cats may have a cognitive origin, with a possible right hemispheric specialization for spatial processing.

---

Alors que chez l'homme, l'asymétrie fonctionnelle des deux hémisphères cérébraux est une donnée classique, les premières recherches sur les asymétries hémisphériques chez l'animal — qu'elles soient d'ordre anatomique, cognitif ou moteur — n'ont commencé à se développer que vers les années 1960. Bien que quelques auteurs se soient intéressés à la latéralisation comportementale dans des espèces aussi diverses que le perroquet [1], la souris ([2], [3]), et le chat [4], ce problème n'a été le plus souvent abordé que chez les primates non humains. Pourtant, résultats obtenus et interprétations proposées divergent fréquemment. Pour Warren ([5], [6]), la latéralisation chez l'animal n'est pas homologue de la latéralisation humaine, mais dépendrait principalement d'artéfacts expérimentaux

ou de biais induits par l'environnement. En revanche, l'hypothèse d'une évolution phylogénétique de la latéralisation des prosimiens à l'homme a récemment été proposée par MacNeilage et coll. [7]. Selon ces auteurs, la main gauche prévaudrait initialement pour les mouvements de capture, alors que la main droite d'abord prépondérante dans le maintien de la posture chez les prosimiens se spécialiserait ultérieurement pour les manipulations fines. Au cours de travaux récents nous avons mis en évidence chez le singe une préférence de la main gauche dans des tâches visuo-spatiales ([8], [9]). Cette préférence peut refléter la spécialisation de l'hémisphère droit pour le traitement d'informations spatialisées. Certains auteurs ont même suggéré cette spécialisation de l'hémisphère droit chez le rat [10] et chez l'oiseau [11]. Qu'en était-il dès lors pour un prédateur naturel comme le chat, chez lequel les activités motrices visuo-spatiales sont bien développées? Quelques études menées chez cet animal ont précédemment fait état d'une préférence marquée pour un des membres antérieurs, mais les résultats sont restés peu convaincants quant à une préférence gauche ou droite au niveau de la population ([12] à [16]). En outre, aucune étude comparative des performances visuo-motrices réalisées par chacune des pattes n'a été, à notre connaissance, effectuée.

Notre travail a porté sur une période de 6 années et regroupe les résultats de 44 chats mâles. Dans l'exécution d'un mouvement de pointage en direction d'une cible mobile, activité proche de l'acte naturel de capture de proie, nous avons analysé tout à la fois la préférence pour l'un ou l'autre des membres antérieurs et les performances de précision et de vitesse d'exécution.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — 44 chats mâles d'un poids moyen de 3,5 kg ont été dressés à exécuter un mouvement de pointage en direction d'une cible mobile [17]. L'animal était placé (*fig. 1*) face à un écran incliné sur lequel pouvait apparaître une cible lumineuse aux déplacements quasi aléatoires. L'essai commençait par l'émission d'un « bip » sonore lui indiquant de s'immobiliser et de placer chacune de ses pattes antérieures sur une plaque « de contact ». Après un délai variable (200-2 000 ms), le spot apparaissait en un point quelconque de l'écran. L'animal disposait alors de 10 s pour atteindre la cible et les deux premières tentatives de pointage effectuées ont été considérées pour cette étude. Il restait à tout moment libre du choix de la patte qu'il utilisait. Les plaques « de contact » permettaient de noter la patte (gauche ou droite) effectuant le pointage et de dater le début du mouvement (correspondant à la perte de contact de la patte avec la plaque). Lorsque le mouvement de pointage atteignait la cible, l'essai était automatiquement interrompu grâce à un détecteur de proximité et le chat recevait une dose de lait. Les erreurs de pointage étaient appréciées pendant l'expérience par l'expérimentateur en contrôle vidéo. Les performances des chats étaient enregistrées 5 jours sur 7, et chaque session comportait 60 essais.

Après un entraînement d'une durée de 4 à 6 mois, les stratégies et les scores étaient stabilisés. Les performances visuo-motrices étaient alors enregistrées pendant 5 à 10 sessions de test. Pour chaque tentative, on notait la patte (gauche ou droite) exécutant le pointage et l'issue du mouvement (tentative réussie ou incorrecte). Pour la première tentative de chaque essai lorsqu'elle était réussie, on enregistrait également le temps de réaction (TR), délai entre l'apparition de la cible et le soulèvement de la patte, et le temps de mouvement (TM), délai entre le soulèvement de la patte exécutant le pointage et le contact avec la cible.

**RÉSULTATS.** — Les 44 chats ont réalisé un total de 23 422 essais. Dans 69,6 % des cas ( $n=16\,307$ ), la première tentative a atteint la cible. Les autres essais ( $n=7\,115$ ) ont donc

impliqué la réalisation de deux tentatives successives, ce qui porte à 30 537 le nombre total de tentatives réalisées. L'analyse a considéré tout à la fois la patte utilisée par l'animal, et les performances visuo-motrices réalisées : précision et vitesse du mouvement (TR et TM).

*A. Latéralisation.* — La latéralisation de chaque animal a été déterminée à partir des tentatives totales (qu'elles atteignent ou non la cible). Si l'on considère l'ensemble des tentatives réalisées par les 44 animaux, 55,6 % d'entre elles ont été exécutées avec la patte gauche, la patte droite ne réalisant donc que 44,4 % des pointages. Ces deux pourcentages ne sont pas statistiquement différents. En revanche, si l'on considère la répartition des 44 sujets en fonction du pourcentage d'utilisation de leur patte gauche (*fig. 2*), cette distribution apparaît clairement asymétrique. Au critère de latéralisation minimal (50 %), la moitié des sujets ( $n=22$ ) présentent une préférence gauche et l'autre moitié ( $n=22$ ) une préférence droite. L'adoption d'un critère beaucoup plus élevé (90 %) fait clairement apparaître l'asymétrie de la distribution obtenue. Alors que 17 chats étaient gauchers, 6 seulement étaient droitiers et 21 restaient sans préférence. Parmi les chats latéralisés à 90 %, les chats gauchers étaient donc significativement plus nombreux que les chats droitiers (test chi 2 bilatéral,  $p < .02$ ). En revanche, parmi les 21 chats sans préférence au critère de 90 %, l'application du critère de latéralisation à 50 % fait apparaître un nombre significativement plus grand (test chi 2 bilatéral,  $p < .01$ ) de droitiers ( $n=16$ ) que de gauchers ( $n=5$ ). Les chats gauchers sont donc plus fortement latéralisés que les droitiers.

*B. Analyse des performances visuo-motrices.* — L'analyse des performances réalisées dans ce test a porté sur la précision du mouvement, le TR et le TM. Nous avons retenu un indice de précision correspondant, pour chaque chat (et pour chaque patte si nécessaire), au rapport (variant de 0 à 1) du nombre total de tentatives ayant atteint la cible sur le nombre total de tentatives effectuées. Avec cet indice appliqué à l'ensemble des sujets, les chats latéralisés au critère de 90 % ne se sont pas révélés significativement plus précis que les chats sans préférence. En effectuant une comparaison entre performances de chaque patte sur l'ensemble du groupe, on observe que la précision moyenne atteinte avec la patte gauche (0,67) ne diffère pas significativement de celle obtenue avec la patte droite (0,63). En revanche, si l'on compare la précision moyenne de la patte la plus utilisée (0,69) et celle de la patte la moins utilisée (0,62), la différence est significative (Test T Wilcoxon bilatéral,  $p < .02$ ).

Pour l'analyse de la rapidité du mouvement, nous n'avons considéré que les essais pour lesquels la première tentative avait correctement atteint la cible ( $n=16\ 307$ ). Pour ces essais, nous disposons des TR et des TM. La comparaison des chats latéralisés à 90 % et des chats sans préférence a montré que les chats latéralisés sont capables de déclencher leur geste significativement plus rapidement (TR moyen = 234 ms) que les chats sans préférence (TR moyen = 283 ms, test *t* bilatéral,  $p < 0.05$ ). Aucune différence significative n'est apparue pour les TR entre patte gauche et patte droite. En revanche la patte la plus utilisée déclenchait le mouvement plus rapidement (TR moyen = 270 ms) que la patte la moins utilisée (TR moyen = 290 ms, *t*-test bilatéral pour séries appariées,  $p < .02$ ). Les comparaisons statistiques des TM entre groupes de sujets ou entre pattes gauche et droite n'ont fait apparaître aucune différence significative. En revanche la patte la plus utilisée exécutait le mouvement plus rapidement (TM moyen = 266 ms) que la patte la moins utilisée (TM moyen = 285 ms, *t*-test bilatéral pour séries appariées,  $p < .05$ ).

DISCUSSION. — Pour l'essentiel donc, à partir d'un test de pointage en direction d'une cible mobile, la distribution de 44 chats en fonction de l'utilisation de chacun de leurs membres antérieurs a fait apparaître un nombre significativement plus grand de gauchers que de droitiers (au critère de 90 %) et a montré que les gauchers ont une latéralité plus marquée que les droitiers. En d'autres termes, alors qu'un chat gaucher a tendance à ne plus utiliser sa patte droite, un chat droitier persiste à réaliser un nombre élevé de tentatives de pointage avec sa patte gauche. En ce qui concerne les performances réalisées par l'ensemble du groupe, la patte la plus utilisée, qu'elle soit gauche ou droite, est la plus précise et la plus rapide. De plus, à précision égale, les chats latéralisés (au critère de 90 %) déclenchent plus rapidement leur mouvement que les sujets sans préférence. Cette conjonction entre précision et rapidité de déclenchement et d'exécution peut représenter, pour les animaux latéralisés, un réel avantage dans une situation naturelle de prédation. Il est particulièrement intéressant de noter que la seule étude [15] ayant montré un biais significatif en faveur du membre antérieur gauche a porté sur un comportement d'atteinte d'une cible mobile. Les études concernant les préférences de pattes chez le chat et n'ayant pas mis en évidence un tel biais ([4], [12], [13], [14]) ne s'intéressaient pas non plus à un tel comportement de prédation. Notre étude montre également une cohérence entre préférences et performances puisque la patte la plus utilisée est tout à la fois plus précise et plus rapide.

La préférence gauche qui s'est manifestée ici chez le chat rappelle celle que nous avons déjà observée chez le primate ([8], [9]). Chez le chat, et peut-être chez le singe, la tendance à utiliser préférentiellement le membre gauche pourrait être la conséquence de l'utilisation de la plus courte voie entre les aires corticales droites impliquées de façon prépondérante dans le traitement des informations de nature spatiale et le cortex moteur droit gouvernant le membre gauche. La latéralisation motrice gauche ne serait alors que le reflet de la spécialisation « cognitive » de l'hémisphère droit. Chez l'homme, on a décrit un avantage de la main gauche dans des activités manipulo-spatiales [18] mais également dans la réalisation de mouvements balistiques [19].

Ce travail est la première démonstration d'une latéralisation de préférence et de performance dans un groupe important de chats. Il fournit des indications quant à la phylogenèse des processus de latéralisation. D'autres études devraient contribuer à évaluer la validité du chat comme modèle animal de la spécialisation hémisphérique chez l'homme.

Note remise le 17 juillet 1991, acceptée le 14 août 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] L. J. ROGERS, Latéralization in the avian brain, *Bird Behaviour*, 2, 1980, p. 1-12.
- [2] R. L. COLLINS, When left handed mice live in right handed worlds, *Science*, 187, 1975, p. 181-184.
- [3] P. SIGNORE, M. NOSTEN-BERTRAND, M. CHAOUÏ, P. L. ROUBERTOUX, C. MARCHALAND et F. PEREA-DIAZ, An assessment of handedness in mice, *Physiology and Behavior*, 49, 1991, p. 701-704.
- [4] J. M. WARREN, J. M. ABPLANALP et H. B. WARREN, The development of handedness in cats and rhesus monkeys. In H. W. STEVENSON, E. H. HESS et H. L. RHEINGOLD éd., *Early Behavior: Comparative and Developmental Approaches*, New York, John Wiley, 1967, p. 73-101.
- [5] J. M. WARREN, Handedness and cerebral dominance in monkeys. In S. HARNAD, R. W. DOTY, L. GOLSTEIN, J. JAYNES et G. KRAUTHAMER éd., *Lateralization in the nervous system*, Academic Press, New York, 1977, p. 151-172.
- [6] J. M. WARREN, Handedness and laterality in humans and other animals, *Physiological Psychology*, 8, 1980, p. 351-359.

- [7] P. F. MACNEILAGE, M. G. STUDDERT-KENNEDY et B. LINDBLOM, Primate handedness reconsidered, *Behavioral and Brain Sciences*, 10, 1987, p. 247-303.
- [8] J. FAGOT et J. VAUCLAIR, Handedness and bimanual coordination in the Lowland Gorilla, *Brain Behavior and Evolution*, 32, 1988, p. 89-95.
- [9] J. FAGOT et J. VAUCLAIR, Handedness and manual specialization in the baboons, *Neuropsychologia*, 26, 1988, p. 795-804.
- [10] V. L. BIANKI, Hemispheric specialization of the animal brain for information processing principles, *International Journal of Neuroscience*, 20, 1983, p. 75-90.
- [11] R. J. ANDREW, The development of visual lateralization in the domestic chick, *Behavioural Brain Research*, 29, 1988, p. 201-209.
- [12] J. COLE, Paw preference in cats related to hand preference in animals and man, *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48, 1955, p. 137-140.
- [13] E. FORWARD, J. M. WARREN et K. HARA, The effects of unilateral lesions in sensorimotor cortex on manipulation by cats, *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 55, 1962, p. 1130-1135.
- [14] C. E. OLMSTEAD et J. R. VILLABLANCA, Effects of caudate nuclei or frontal cortical ablation in cats and kittens: Paw usage, *Experimental Neurology*, 63, 1979, p. 559-572.
- [15] W. J. BURGESS et J. R. VILLABLANCA, Recovery of function after neonatal or adult hemispherectomy in cats. II Limb bias and development, paw usage, locomotion, and rehabilitative effects of exercises, *Behavioural Brain Research*, 20, 1986, p. 1-8.
- [16] U. TAN, M. YAPRAK et N. KUTLU, Paw preference in cats: Distribution and sex differences, *International Journal of Neuroscience*, 50, 1990, p. 195-208.
- [17] M. FABRE-THORPE, A. VIÉVARD, C. ANDRÉ, J. FUZELLIER et P. BUSER, Visually guided movements in the cat: a test using a randomly moving target, *Behavioural Brain Research*, 11, 1984, p. 11-19.
- [18] J. E. LEDOUX, D. H. WILSON et M. S. GAZZANIGA, Manipulo-spatial aspect of cerebral lateralization: Clues to the origins of lateralization, *Neuropsychologia*, 15, 1977, p. 743-749.
- [19] Y. GUIARD, G. DIAZ et D. BEAUBATON, Left hand advantage in right handers for spatial constant error: Preliminary evidence in a unimanual ballistic aimed movement, *Neuropsychologia*, 21, 1983, p. 111-115.

M. F.-T. : Institut des Neurosciences (C.N.R.S.-U.P.M.C.),  
 Département de Neurophysiologie comparée, 9, quai Saint-Bernard, 75230 Paris Cedex 05;  
 J. F. et J. V. : C.N.R.S., Laboratoire de Neurosciences fonctionnelles,  
 Unité de Neurosciences cognitives, 31, chemin Joseph-Aiguier, 13402 Marseille Cedex 09.

#### EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Vue schématique du dispositif. *a* : caméra vidéo, *b*, paroi opaque, *c* : coupelle d'arrivée de la récompense (lait), *d* : lait, *e* : table XY, *f* : écran translucide, *g* : ampoule générant le spot cible sur l'écran translucide, *h* : détecteur de proximité, *i* : distributeur de récompense, *j* : haut parleur générant le bip sonore, *k* : plaque de « départ ».

Fig. 1. — Set-up. *a*: video camera, *b*, opaque wall, *c*: reward delivery (milk), *d*: milk, *e*: XY plotter, *f*: translucent screen, *g*: bulb producing the target spot on the translucent screen, *h*: proximity detector, *i*: reward dispenser, *j*: loud speaker for the task sound, *k*: starting plate.

Fig. 2. — Distribution des sujets en fonction du pourcentage de tentatives réalisées avec la patte gauche (par rapport au nombre de tentatives totales).

Fig. 2. — Distribution of the cats as a function of the percentage of attempts performed with the left paw relatively to the overall number of attempts.

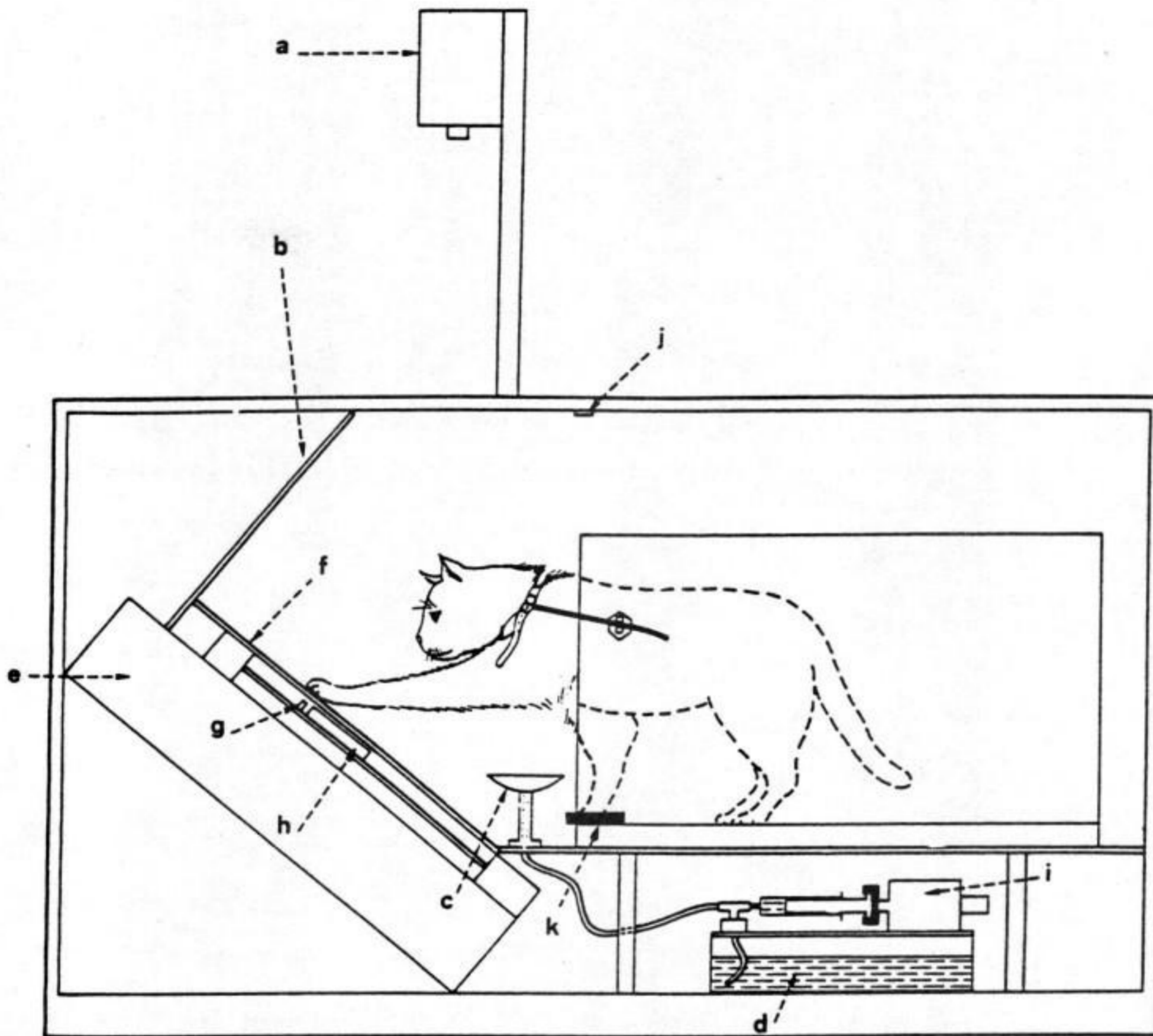


Fig. 1

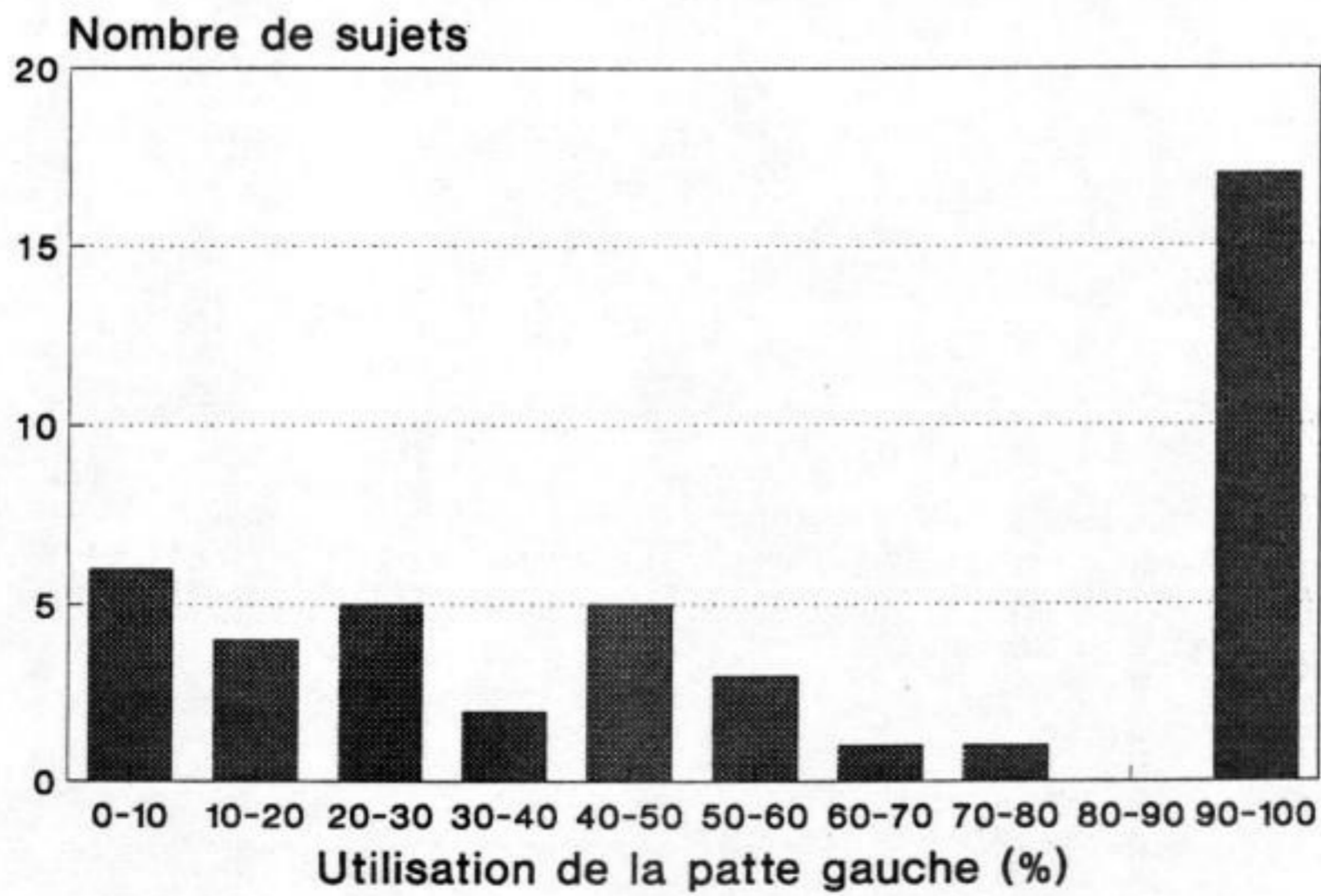


Fig. 2



## Évaluation de la perfusion myocardique par scintigraphies planaires au repos et à l'effort, réalisées respectivement au $^{201}\text{Tl}$ et au $^{99m}\text{Tc}$ SestaMIBI

Pierre de VERNEJOU, Pierre ALBARÈDE, Dominique ÉTIENNE, Gilbert RICHARDOT  
et André VACHERON

**Résumé** — Les scintigraphies planaires au repos et à l'effort, réalisées respectivement au  $^{201}\text{Tl}$  et au  $^{99m}\text{Tc}$  SestaMIBI permettent, en utilisant des conditions de spectrométrie rigoureuses, d'obtenir pour une même incidence deux images scintigraphiques distinctes. Par analyse numérique différentielle de ces images, il est possible de calculer l'importance de l'ischémie d'effort et d'évaluer la vitalité du myocarde.

### Evaluation of myocardial perfusion by differentiating planar scintigraphy at rest and at stress, respectively using the $^{201}\text{Tl}$ and the $^{99m}\text{Tc}$ SestaMIBI

**Abstract** — The differentiating planar scintigraphy at rest and at stress, respectively using  $^{201}\text{Tl}$  and  $^{99m}\text{Tc}$  SestaMIBI, within strict spectrometric conditions, allow two distinct images to be obtained for the same views which permits calculation of the importance of the ischemic defects at stress and evaluation of myocardial vitality, when analysed by computer-assisted techniques.

**Abridged English Version** — Thallium chloride ( $^{201}\text{Tl}$ ) and technetium labelled SestaMIBI ( $^{99m}\text{Tc}$  SestaMIBI) are radiotracers extracted by the normal myocardial cell ([1], [4]). Their myocardial uptake reflects regional coronary blood flow. Tl is rapidly redistributed deleting perfusion defects in case of simple stress ischemia [2], whereas Tc is fixed for several hours [5]. In a given healthy subject, scintigraphic images with the two radiotracers are identical. In case of stress ischemia, hypoperfused areas are evaluated by comparing rest and stress scintigraphic images.

We have associated both tracers in the same imaging procedure to improve the quality of the results and the quantification of ischemia.

Planar scintigrams are obtained with a gamma camera after intravenous injection at rest of 100 to 150 MBq of  $^{201}\text{Tl}$ . The same amount of  $^{99m}\text{Tc}$  SestaMIBI is injected at peak exercise. Images are obtained from the following views: anterior, LAO45° and LAO70°.

Laboratory studies with phantoms reproducing *in vivo* imaging conditions, showed that contamination of the respective images by either radiotracer never exceeds 5% with the same amount of Tl and Tc activity and in strict spectrometry conditions (window width of  $\pm 10\%$  of the peak energy chosen for each isotope).

It is essential to use Tc only for exercise imaging of defects in patients with stress ischemia, in order to avoid partial filling of the defects on Tl scintigraphy by part of the Compton scatter from Tc within the Tl window.

The same applies after dipyridamole injection instead of exercise.

Rest (Fig. 1) and stress (Fig. 2) images are quantitatively analysed from 0 to 360° with 3° increments from the 0° radius derived from the centre of the region of interest ([6], [7]). The 120 values obtained are used to plot the circumferential analysis. Modifications of the ratio of the areas under the normalized curves at rest and after exercise allow the perfusion defects due to stress ischemia to be assessed (Fig. 3).

Note présentée par Jean HAMBURGER.



This protocol has been applied to 80 subjects.

For a given patient, rest  $^{201}\text{Tl}$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI images with or without defects, are strictly superposable, and circumferential analysis shows identical behaviour of the two tracers (Fig. 4).

As  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI is fixed, no redistribution occurs once the radiotracer has been extracted by myocardial cells. Differential analysis between fixed exercise  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI and rest  $^{201}\text{Tl}$  images allows assessment of the perfusion defect.

For a given view, the patient position with regard to the camera does not change, since both images are acquired consecutively. The images are strictly superposable, allowing valuable quantitative analysis. The consecutive acquisition of the couples of scintigrams for each view shortens the duration of the method.

After stress thallium scintigraphy, a low uptake can be attenuated by early tracer redistribution from as early as the 10th minute after exercise completion [3]. Comparison between fixed stress  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI and rest  $^{201}\text{Tl}$  images avoids this cause of error and allows perfusion defects to be evaluated.

This technique requires amounts of radioactivity far below those usually used. In these experimental conditions, there is no deterioration of the quality of images and measures, the preset-count being the same as for usual thallium scintigrams, especially as a small area camera is used.

This technique permits simultaneous investigation of myocardial perfusion and viability.

La visualisation des territoires myocardiques normalement perfusés est obtenue par scintigraphie. La comparaison des scintigraphies de repos et d'effort permet la mise en évidence des territoires ischémiés. Les radiotraceurs les plus utilisés, chlorure de thallium ( $^{201}\text{Tl}$ ) ou technétium complexé au SestaMIBI ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI), pénètrent la cellule myocardique saine. Chez un même sujet normal, les images sont similaires [1]. L'objectif de ce travail a été d'associer les deux indicateurs au cours du même examen pour améliorer la précision des résultats et quantifier l'importance de l'ischémie, tout en diminuant la durée de l'examen.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODE. — 1.1. *Indicateurs*. — 1.1.1. Le  $^{201}\text{Tl}$  (raie X de 80 keV à 90 % et raies  $\gamma$  de 135 keV à 2 % et 167 keV à 8 %) présente une cinétique précoce proche de celle du potassium. Sa captation myocardique est en étroite corrélation avec le débit coronaire régional. Sa pénétration cellulaire est très rapide et maximale en quelques minutes. La moitié de la quantité fixée est éliminée en moins de 5 h [2]. En cas d'ischémie d'effort, le thallium, injecté à l'acmé de l'effort, pénètre peu ou pas du tout dans les territoires myocardiques selon l'insuffisance de la perfusion. En cas de nécrose cellulaire, il n'y a aucune fixation du traceur.

Après l'effort, on constate une redistribution du thallium vers les territoires myocardiques alors à nouveau bien perfusés s'il ne s'agit que d'une simple ischémie. Cette redistribution, qui témoigne de la vitalité du myocarde, est maximale à la quatrième heure. Néanmoins, son début peut être précoce, parfois dès la dixième minute, pouvant entacher d'erreur le calcul du degré de redistribution [3].

1.1.2. Le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (raie  $\gamma$  de 149 keV à 89 %) est complexé avec le 2-méthoxy isobutyl isonitrile (SestaMIBI) et s'accumule, comme le thallium, dans le tissu myocardique proportionnellement au débit coronaire régional [4], l'ischémie réduit sa fixation myocardique. A l'inverse du thallium, une fois fixé au niveau cellulaire, il ne présente pas de

redistribution notable dans les heures suivant son administration ce qui permet l'acquisition tardive de l'image [5].

1.2. *Technique.* — Les scintigraphies planaires sont obtenues avec une caméra à scintillation à petit champ de 18 cm de diamètre, munie d'un collimateur parallèle à haute sensibilité et reliée à un ordinateur numérique (Siemens SAM).

Le spectromètre est calé sur la raie X de 80 keV pour l'image au thallium et sur le pic photoélectrique de 140 keV pour le technétium; dans les deux cas la largeur de fenêtre est de  $\pm 10\%$  de la valeur de l'énergie choisie. Nous avons réalisé des études *sur fantômes* reproduisant les conditions de mesure *in vivo*, qui ont permis de constater que pour d'égales activités de Tl et de Tc et dans les conditions de spectrométrie utilisées, la contamination des images de l'un par l'autre des traceurs et réciproquement n'excède pas 5% dans les cas les plus défavorables.

La fraction du rayonnement Compton, due au Tc, comprise dans la fenêtre de mesure du Tl risque d'entraîner un comblement partiel d'une image lacunaire sur la scintigraphie au Tl. Pour éviter cet artefact, il est indispensable de réserver le Tc à l'image d'effort qui présente des zones lacunaires en cas d'ischémie d'effort.

30 mn après injection intraveineuse de 100 à 150 MBq de  $^{201}\text{Tl}$  sur le patient au repos, on fait effectuer une épreuve d'effort sur bicyclette ergométrique. A l'acmé de l'effort une activité équivalente de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI est injectée. L'élimination du  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI se faisant principalement par les voies hépato-biliaires, une ingestion de sorbitol suivie d'une attente de 1 h avant l'acquisition des images permet une diminution sensible du bruit de fond extracardiaque et le rend comparable sur les deux scintigraphies de chacune des trois incidences classiques, face antérieure, O.A.G. 45° et O.A.G. 70°. Les acquisitions sont réalisées en précompte de 500 000 impulsions comme cela est classique dans les épreuves au thallium et avec les conditions de spectrométrie définies ci-dessus. La même technique est utilisée après injection de dipyridamole en remplacement de l'épreuve ergométrique, lorsque cette dernière ne peut être pratiquée.

2. TRAITEMENT DES DONNÉES. — Les figures 1 et 2, en incidence face antérieure, représentent, après soustraction bilinéaire du bruit de fond [6], les scintigraphies myocardiques de repos au  $^{201}\text{Tl}$  (*fig. 1*) et d'effort au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI (*fig. 2*).

Qualitativement, ces images correspondent à une importante cardiomégalie, le grand axe du ventricule gauche est de 13 cm, présentant une empreinte cavitaire centrale extrêmement nette et une hypofixation apicale retrouvée tant au repos qu'à l'effort. On constate par contre sur l'image d'effort une importante hypofixation antérieure localisée dans le sens horaire de 330 à 120° (0° situé à midi) qui n'est pas retrouvée sur l'image de repos.

Quantitativement, les images de repos et d'effort sont analysées, pour chaque incidence, de 0 à 360° par incrément de 3° à partir du rayon 0° (*fig. 2*) issu du centre de la zone d'intérêt [7]. Ces 120 valeurs donnent les tracés des analyses circonférentielles. Les modifications du rapport des surfaces circonscrites par les courbes normalisées de repos et d'effort permettent d'évaluer les déficits de perfusion dus à l'ischémie d'effort (*fig. 3*), les différents territoires étant individualisés entre index.

3. RÉSULTATS. — Cette technique a été appliquée sur 80 sujets, se répartissant en 59 hommes et 21 femmes, d'un âge moyen de 57 ans  $\pm$  14 (les extrêmes étant de 35 et 81 ans). Cette population se compose de 54 insuffisances coronariennes et 26 infarctus du myocarde datant de plus de 3 mois. 71 sujets ont eu une épreuve d'effort sur bicyclette

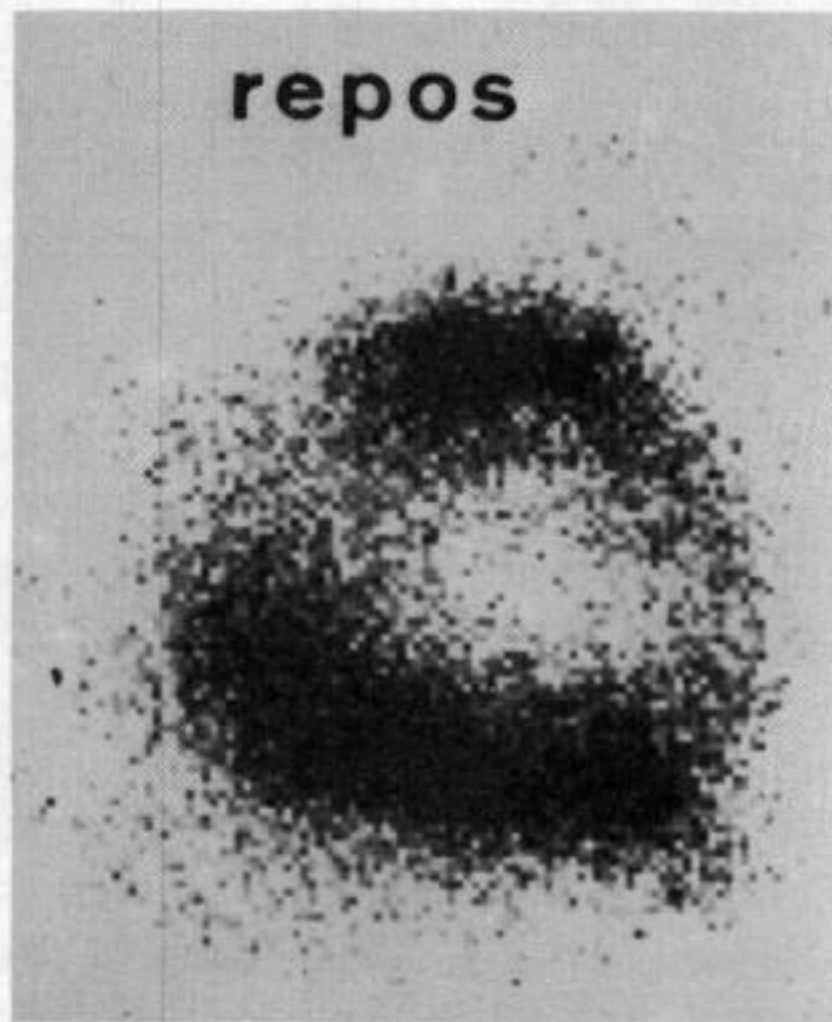


Fig. 1

Fig. 1. — Scintigraphie myocardique au repos, en incidence face antérieure, réalisée au  $^{201}\text{Tl}$ .

*Fig. 1. — Myocardial scintigram, anterior view, at rest, using  $^{201}\text{Tl}$ .*

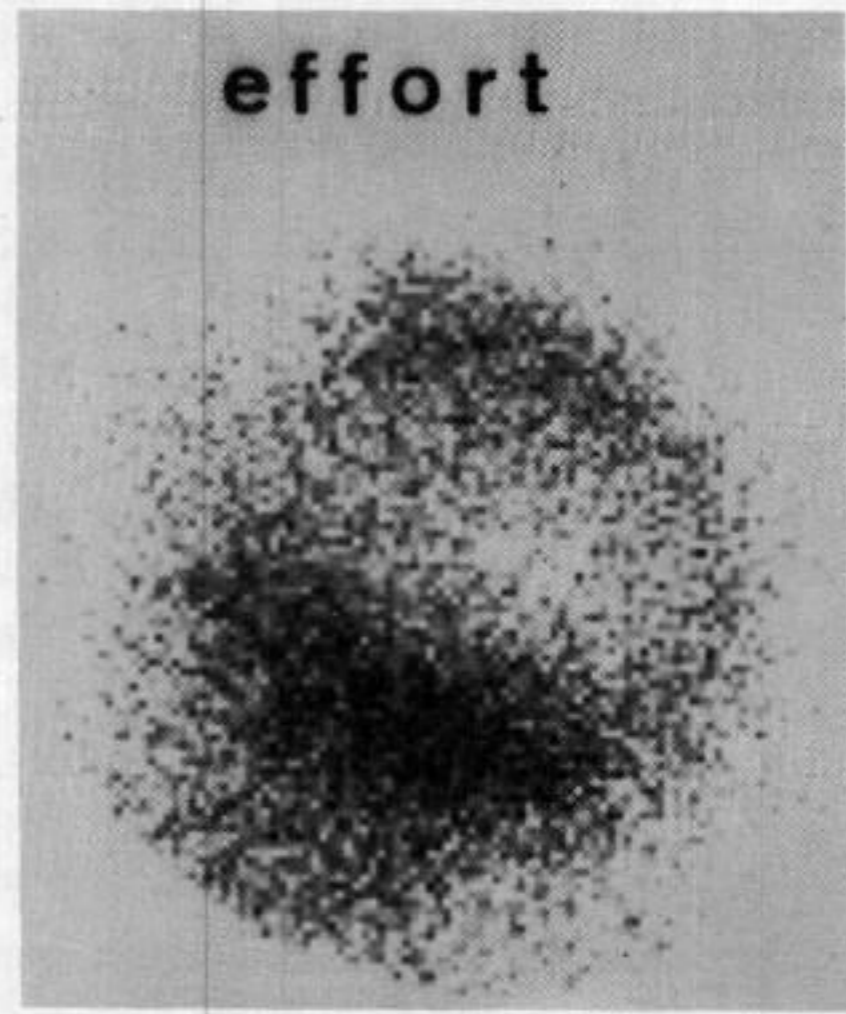


Fig. 2

Fig. 2. — Scintigraphie myocardique d'effort du même patient, en incidence face antérieure, réalisée au  $^{99m}\text{Tc}$  SestaMIBI : hypofixation antérieure importante (de 330 à 120°).

*Fig. 2. — Myocardial scintigram at stress for the same patient, anterior view, using  $^{99m}\text{Tc}$  SestaMIBI, showing a severe defect between 330 and 120°.*

ergométrique, arrêtée sur critère électrocardiographique ou de douleur précordiale, la fréquence cardiaque atteinte correspondant en moyenne à 73 % de la Fréquence Cardiaque Maximale Théorique ( $\text{FCMT} = 220 - \text{l'âge}$ ).

9 sujets ont subi une épreuve au dipyridamole.

3.1. Chez un même patient, au repos, les images obtenues au  $^{201}\text{Tl}$  et au  $^{99m}\text{Tc}$  SestaMIBI, présentant ou non des zones pariétales lacunaires dues à une nécrose, sont rigoureusement superposables, validant par-là même nos conditions de spectrométrie et l'analyse circonférentielle montre l'identité de comportement des deux traceurs (*fig. 4*).

3.2. L'analyse différentielle entre l'image au  $^{99m}\text{Tc}$  SestaMIBI à l'effort et celle obtenue au repos avec le  $^{201}\text{Tl}$  permet d'évaluer le déficit de perfusion à l'effort.

3.3. 12 sujets ayant eu successivement une épreuve classique au thallium et une épreuve selon cette nouvelle technique ont été pris comme témoins. On constate que les zones pathologiques sont superposables et que l'importance de la redistribution du thallium est proportionnelle au déficit de perfusion mesuré par l'association thallium-SestaMIBI.

4. DISCUSSION. — 4.1. *Méthodologie.* — La bonne superposition de l'image au repos avec celle obtenue lors d'une précédente scintigraphie myocardique au Tl chez 12 sujets pris comme témoins montre que la contamination par le Tc est négligeable.

Il en est de même des images au Tl et au Tc dans les cas d'infarctus du myocarde avec image lacunaire et absence de déficit de perfusion à l'effort. Les courbes obtenues par analyse circonférentielle sont dans ce cas parfaitement superposables et confirment la validité des conditions de spectrométrie retenues à partir des résultats obtenus *in vitro*.

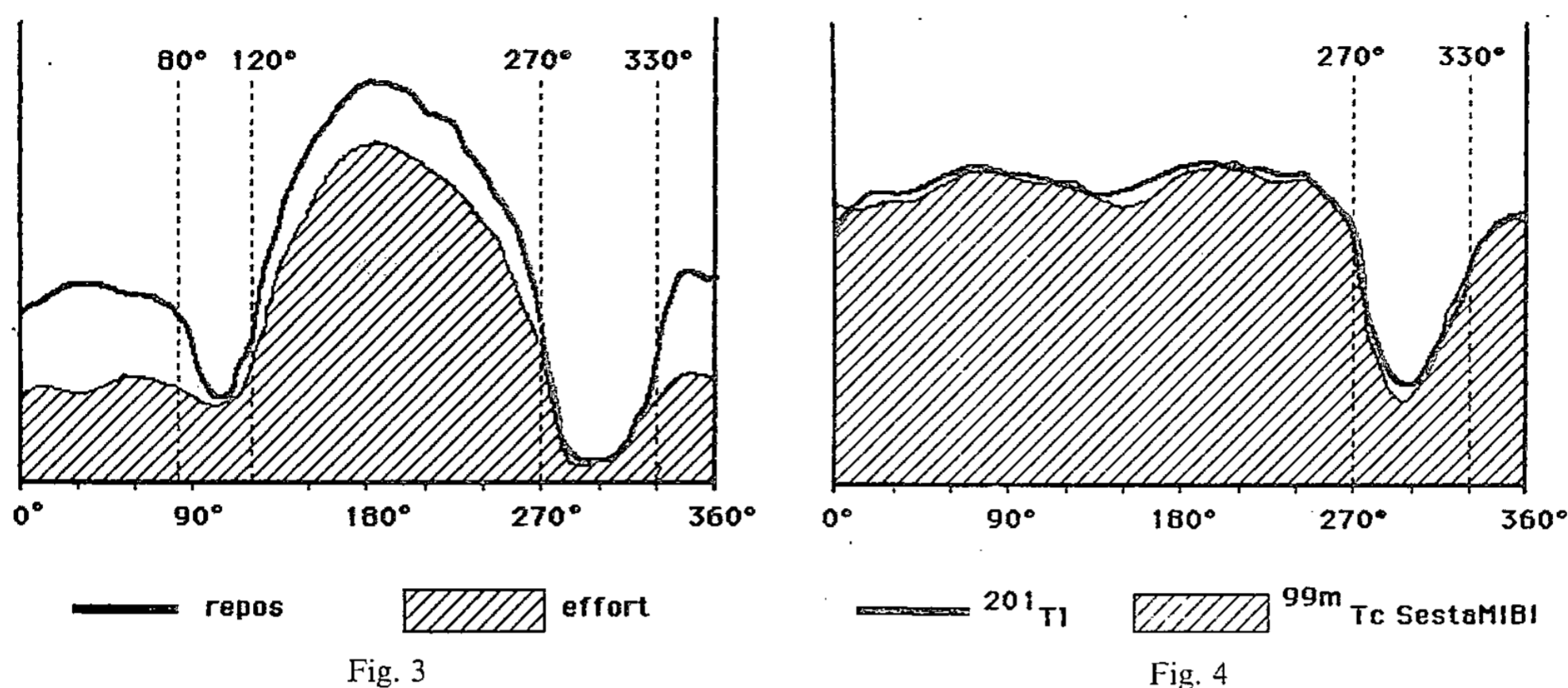


Fig. 3. — Analyses circonférentielles normalisées des scintigraphies du même patient (fig. 1 et 2) au repos et à l'effort. Le rapport des intégrales entre index quantifie le déficit de perfusion : 52 % entre 0 et 80°, 10 % entre 80 et 120°, 16 % entre 120 et 270°, 51 % entre 330 et 360°. L'intervalle entre 270 et 330° correspond au plan des valves.

Fig. 3. — Normalized circumferential analysis of scintigrams for the same patient (Figs. 1 and 2) at rest and at stress. The ratio of the integrals between indexes measures the defect of perfusion: 52% between 0 and 80°, 10% between 80 and 120°, 16% between 120 and 270°, 51% between 330 and 360°. The space between 270 and 330° agree with the position of the valves.

Fig. 4. — Analyses circonférentielles normalisées des scintigraphies de repos, au  $^{201}\text{Tl}$  et au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI chez un sujet normal, en incidence face antérieure. L'identité des courbes (rapport des intégrales compris entre 0,98 et 1,01) montre que l'espace de perfusion est le même pour les deux indicateurs. (L'intervalle entre 270 et 330° correspond au plan des valves).

Fig. 4. — Normalized circumferential analysis of two scintigrams on a normal subject at rest, using  $^{201}\text{Tl}$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI. The similarity between curves (the ratio of the integrals is included between 0.98 and 1.01) show that perfusion spaces for the two isotopes are the same. (The space between 270 and 330° agrees with the position of the valves.)

4.2. *Avantages de cette technique.* — 4.2.1. L'acquisition des images scintigraphiques est obtenue dans un temps beaucoup plus court qu'avec la technique habituelle au Tl (1 h 30 mn contre 4 h en moyenne).

4.2.2. Pour une même incidence, les deux scintigraphies étant réalisées consécutivement, la position du patient par rapport à la caméra ne varie pas et les images parfaitement superposables permettent une meilleure analyse quantitative que des acquisitions séparées par un intervalle de quatre heures avec repositionnement du patient.

4.2.3. Lors de l'épreuve d'effort au thallium, l'hypofixation peut être atténuée par une éventuelle redistribution précoce du traceur qui peut commencer dès la dixième minute après l'arrêt de l'effort, perturbant de ce fait les dernières images « précoces ». La comparaison entre l'image stable au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI à l'effort et celle de repos au  $^{201}\text{Tl}$  permet d'éviter cette cause d'erreur.

4.2.4. Cette technique, utilisant deux isotopes différents en scintigraphie planaire plutôt que le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  SestaMIBI seul en tomoscintigraphie, permet la mise en œuvre d'activités inférieures à celles habituellement administrées. La qualité de l'image reste toutefois comparable à celle obtenue avec le Tl puisqu'un précompte identique est utilisé pour la constitution de l'image (500 000 impulsions). Il est évident que la taille réduite

de notre détecteur améliore de façon très substantielle le rapport signal sur bruit (intégrale du comptage en regard de la zone cardiaque sur intégrale du comptage de l'ensemble de l'image) par rapport aux caméras à grand champ.

Cette méthode permet à la fois l'exploration de la vitalité myocardique et le calcul d'un éventuel déficit de perfusion à l'effort.

Note remise le 6 mai 1991, acceptée après révision le 16 septembre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] F. J. Th. WACKERS, D. S. BERMAN, J. MADDAHI, D. D. WATSON, G. A. BELLER, H. W. STRAUSS, C. A. BOUCHER, M. PICARD, B. L. HOLMAN, R. FRIDRICH, E. INGLESE, B. DELALOYE, A. BISCHOF-DELALOYE, L. CAMIN et K. MCKUSICK, *J. Nucl. Med.*, 30, 1989, p. 301-311.
- [2] P. DE VERNEJOL, D. DUCASSOU, R. GUJRAUD, J. ROBERT, J.-P. NOBEL et H. WITZ, in *Atlas pratique de scintigraphie cardiaque*, Scheltema et Holkema bv, Utrecht, 1977, p. 4-6.
- [3] G. M. POHOST, N. M. ALPERT, J. S. INGWALL et H. W. STRAUSS, *Sem. Nucl. Med.*, X-1, 1980, p. 70-90.
- [4] R. D. OKADA, D. GLOVER, T. GAFFNEY et S. WILLIAMS, *Circulation*, 77, 1988, p. 491-498.
- [5] W. H. SMITH et D. D. WATSON, *Am. J. Cardiol.*, 66, 1990, p. 16E-22E.
- [6] M. L. GORIS, S. H. DASPIT, P. MCLAUGHLIN et J. P. KRIS, *J. Nucl. Med.*, 17, 1976, p. 744-747.
- [7] D. D. WATSON, N. P. CAMPBELL, E. K. READ, R. S. GIBSON, C. D. TEATES et G. A. BELLER, *J. Nucl. Med.*, 22, 1981, p. 577-584.

*Service de Biophysique et Médecine nucléaire et Clinique cardiologique,  
C.H.U. Necker-Enfants malades, 149, rue de Sèvres, 75748 Paris Cedex 15.*

Photosynthèse/*Photosynthesis*  
(Biophysique/*Biophysics*)

## Photosystem II assembly in 2-day-old bean leaves during the first 16 hrs. of greening

Benoît SCHOEFS and Fabrice FRANCK

**Abstract** — We have studied the assembly of the photosynthetic apparatus during the greening of 2-day-old bean leaves in continuous white light by using fluorimetric methods. We have recorded 77 and 298 K fluorescence kinetics at 690 nm in order to detect electron flow through the photosystem II reaction centre ( $RC_{II}$ ) at increasing greening periods. In those experiments, the 77 K fluorescence spectra were also considered. Charge separation is detected 1 hr. after the onset of the illumination. Room temperature fluorescence variation showing the « O-I-P » phases are detected after 4 hrs. of illumination. Typical fluorescence bands at 688, 697 and 735 nm appear after 14 hrs. of illumination.

### Assemblage du photosystème II dans des feuilles de haricot âgées de 2 jours au cours des 16 premières heures du verdissement

**Résumé** — L'assemblage de l'appareil photosynthétique a été étudié dans des feuilles de haricot âgées de 2 jours par des méthodes fluorimétriques au cours des 16 premières heures de verdissement en lumière continue. Pour des durées de verdissement croissantes, nous avons enregistré les cinétiques de fluorescence à 690 nm à température ordinaire et dans l'azote liquide afin de détecter le flux d'électrons dans le centre réactionnel du photosystème II ( $RC_{II}$ ). Nous avons également enregistré les spectres de fluorescence à 77 K au cours de la même période. Les cinétiques de fluorescence à 77 K montrent que la séparation de charge dans le  $RC_{II}$  peut être induite après 1 h d'illumination. Des variations de fluorescence à 293 K montrant les phases dénommées "O-I-P" sont détectées dès la fin de la 4<sup>e</sup> heure du verdissement. Les spectres de fluorescence à 77 K montrent les bandes typiques centrées à 688, 697 et 735 nm après 14 h d'illumination.

**Version française abrégée** — INTRODUCTION. — De nombreuses études ont été réalisées sur le verdissement des angiospermes ([1]-[2]). Cependant, la majorité de ces études a été réalisée sur des plantes ayant poussé à l'obscurité durant plusieurs jours (de 1 à 3 semaines). Les plantes étiolées contiennent des plastes différenciés en étioplastes, caractérisés par la présence d'un corps prolamellaire [3]. Lorsqu'elles sont éclairées, le corps prolamellaire disparaît et la différenciation en chloroplaste a lieu [4]. Dans des conditions naturelles, les plantes perçoivent la lumière à un stade bien plus précoce de leur développement [5] et le passage par le stade étioplaste n'a pas lieu, le chloroplaste se formant directement à partir du stade proplaste [3]. Les observations décrites ici sont les premières montrant le développement de l'appareil photosynthétique dans les feuilles primordiales très jeunes. Les haricots de 2 jours utilisés pour cette étude contiennent au départ des proplastides [3]. Les feuilles sont encore enfermées dans la graine et ne reçoivent la lumière que par l'intermédiaire de la radicule qui en émerge ([5], [6]).

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — Les graines de haricot (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Commodore) ont été mises à germer pendant 2 jours à l'obscurité puis éclairées sous tubes fluorescents à une intensité de 120 W. Les appareils utilisés et les conditions de culture du haricot sont décrits en détail dans [4], [5] et [7]. Les résultats des expériences reportés ici ont nécessité plus de 1 000 feuilles dont la surface n'excède pas 10-15 mm<sup>2</sup>. Les spectres de fluorescence à 77 K et les cinétiques de fluorescence ont été enregistrés toutes les 15 mn au cours des 16 premières heures du verdissement.

Note présentée par Alexis MOYSE.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Sur la base des spectres de fluorescence à 77 K, on peut diviser les 16 h d'illumination en trois périodes. La première couvre les 3 premières heures durant lesquelles le maximum d'émission de la fluorescence de la chlorophyllide (Cide) se déplace de 673 vers 683 nm (*fig. 1, b et c*). Ce déplacement résulte probablement de l'intégration de la Cide formée durant les premières minutes de l'illumination dans les précurseurs des protéines antennes (pLHCP). La fluorescence variable à 77 K est détectée après 55 mn d'illumination (*fig. 2, b*), démontrant la séparation de charge dans le centre réactionnel du photosystème II (RC<sub>II</sub>) [8]. Son amplitude augmente ensuite avec le temps de l'illumination (*fig. 2, b-d*).

La deuxième période, de la 4<sup>e</sup> à la 13<sup>e</sup> heure du verdissement, est caractérisée par la présence d'une bande de fluorescence unique aux environs de 685 nm (*fig. 1, d*) tandis que la fluorescence variable à 293 K se développe progressivement (*fig. 3*). Celle-ci montre d'emblée les phases « O-I-P » qui traduisent le transfert d'électrons au-delà de Q<sub>A</sub> ([13]-[14]). En présence de DCMU, la phase photochimique montre une forme sigmoïde après 9 h, indiquant l'apparition de transferts d'énergie entre les unités PS<sub>II</sub> (*fig. 4*) [9].

La 3<sup>e</sup> période, de la 14<sup>e</sup> à la 16<sup>e</sup> heure du verdissement, se caractérise par l'apparition dans le spectre de fluorescence à 77 K, d'un épaulement à 697 nm et d'une bande d'émission vers 730 nm (*fig. 1, e*). Ces deux maximums sont caractéristiques du PS<sub>II</sub> et du PS<sub>I</sub> des feuilles vertes [10].

Les résultats présentés ici, bien que semi-quantitatifs montrent que l'ontogenèse de l'appareil photosynthétique se déroule, dans les feuilles très jeunes, à la même vitesse ou à une vitesse légèrement supérieure que dans les feuilles étiolées de pois (Thorne et Boardman, 1971) ou de haricot (Franck et coll., 1984 ; Bertrand et coll., 1988).

INTRODUCTION. — The light-induced greening of angiosperms has been extensively studied in leaves grown in darkness for a long period (etiolated leaves). Only few studies have been performed on very young leaves ([1]-[2]), although they represent the normal stage at which plants are illuminated in nature.

We present here the first observations on the assembly of the photosynthetic apparatus in 2-day-old bean seedlings, which are known to contain proplastids in contrast to older, etiolated leaves containing etioplasts [3]. In the material used here, chloroplast differentiation thus occurs strictly from the proplastid stage. Light reaches the leaves (still hidden between the cotyledons) through the radicle which protrudes from the seedlings ([5]-[6]).

MATERIAL AND METHODS. — Intact seedlings were grown in darkness for 2 days and then illuminated with 120 W fluorescent tubes placed at a 50 cm-distance. Detailed culture conditions are described in [5]. Fluorescence variation at 293 and 77 K were recorded at 690 nm (bandwidth at half-peak: 28 nm) using a 632.8 nm exciting light (5 mW.cm<sup>-2</sup>) as described in [5], [7]. Fluorescence spectra were recorded at 77 K as described in [4] under an excitation light at 436 nm (bandwidth: 46 nm).

RESULTS AND DISCUSSION. — Non-illuminated leaves contain a small amount of photoactive protochlorophyllide (Pide) which results in a 77 K fluorescence band at 657 nm (*Fig. 1, a*), as observed in older, etiolated leaves [11]. When light is turned on, this Pide is rapidly reduced into Cide [12] showing a fluorescence maximum at 673 nm (*Fig. 1, b*). It is well known that in older leaves, the Cide fluorescence maximum shifts

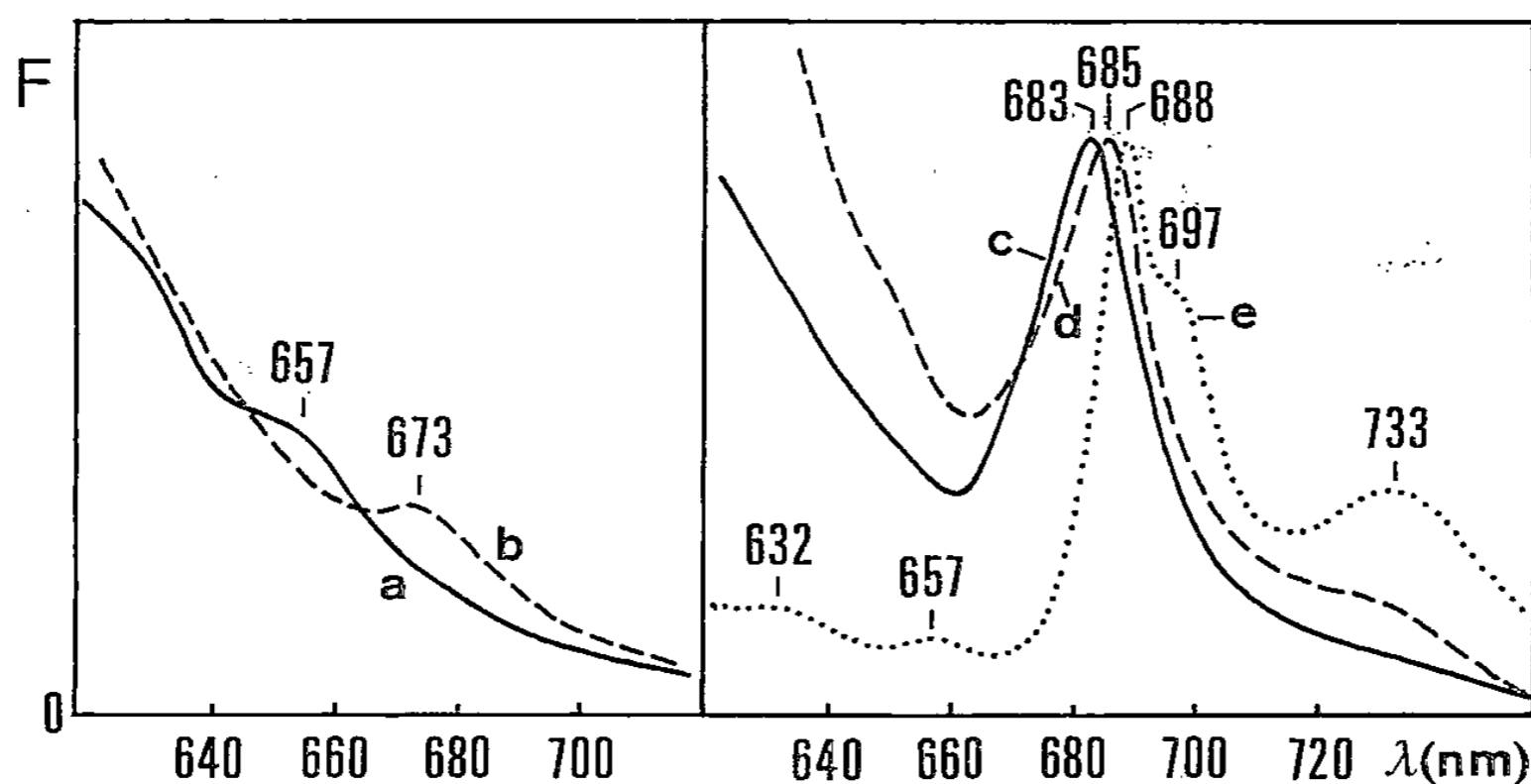
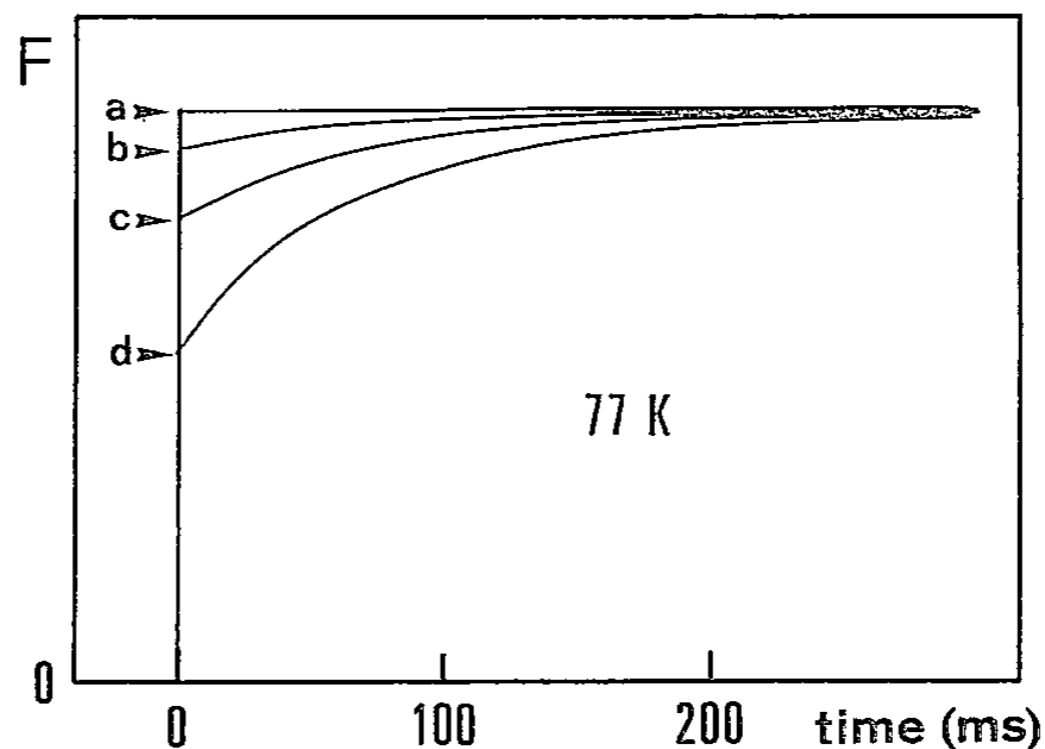


Fig. 1. — 77 K fluorescence emission spectra of 2-day-old leaves before illumination (a) and illuminated for 5 min. (b), 2 hrs. (c), 12 hrs. 45 min. (d) and 16 hrs. (e).

Fig. 1. — Spectres d'émission de la fluorescence à 77 K de feuilles de 2 jours non illuminées (a) et illuminées durant 5 mn (b), 2 h (c), 12 h 45 mn (d) et 16 h (e).

Fig. 2. — 77 K fluorescence kinetics of 2-day-old bean leaves recorded 30 min. (a), 55 min. (b), 1 hr. 55 min. (c) and 10 hrs. (d) after the onset of illumination.

Fig. 2. — Cinétiques de fluorescence à 77 K enregistrées avec des feuilles de 2 jours illuminées durant 30 mn (a), 55 mn (b), 1 h 55 mn (c) et 10 h (d).



from 696 to 683 nm within the first 20-40 min. of illumination [1]. Such a "Shibata shift" is not found in 2-day-old leaves.

After the initial photoreduction step, three periods can be considered on the basis of the 77 K fluorescence spectra recorded every 15 min. during the first 16 hrs. of illumination.

In the 1st period, during the first 3 hrs., the Cide fluorescence shifts from 673 towards 683 nm (Fig. 1, b, c).

In the 2nd period, during the next 10 hrs., the emission bands only show a slight shift from 683 toward 685 nm (Fig. 1, d) and during the 3rd one, after 13 hrs. of illumination, the 695-697 and 733-735 nm bands appear and increase slowly in amplitude while the 685 nm band progressively shifts towards 688 nm (Fig. 1, e).

The sequence of spectral changes reported above coincides with the development of particular functional characteristics which are reflected in the shape of the 298 or 77 K fluorescence kinetics.

During the 1st period, 77 K fluorescence variations become rapidly measurable. This is shown in Figure 2. A slight fluorescence increase is detected already after 55 min., indicating the onset of charge separation capability of PS<sub>II</sub> (Fig. 2, b) [8]. The amplitude



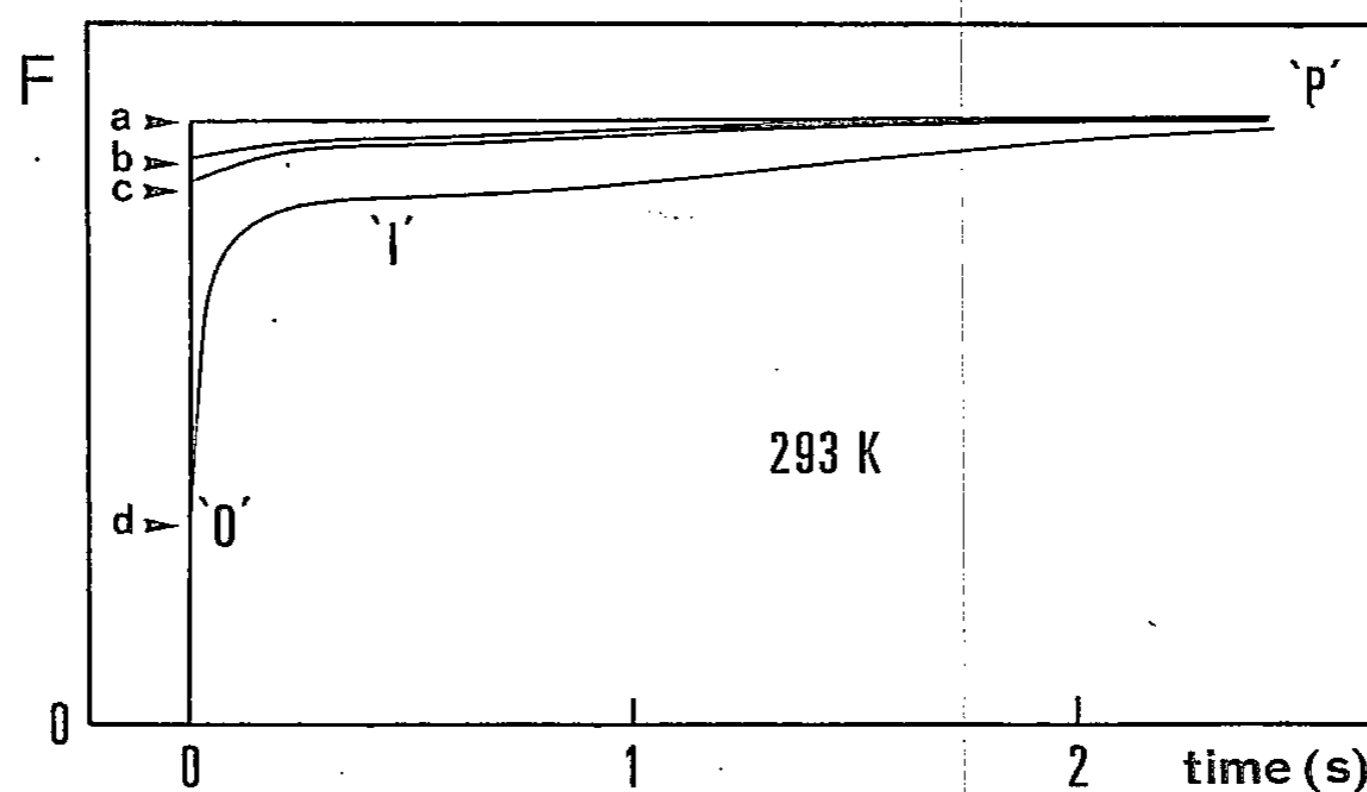


Fig. 3. — 293 K fluorescence kinetics of 2-day-old bean leaves recorded 3 hrs. 15 min. (a), 4 hrs. 20 min. (b), 11 hrs. 45 min. (c) and 16 hrs. (d) after the onset of the illumination.

Fig. 3. — Cinétiques de fluorescence à 293 K enregistrées avec des feuilles de 2 jours illuminées durant 3 h 15 mn (a), 4 h 20 mn (b), 11 h 45 mn (c) and 16 h (d).

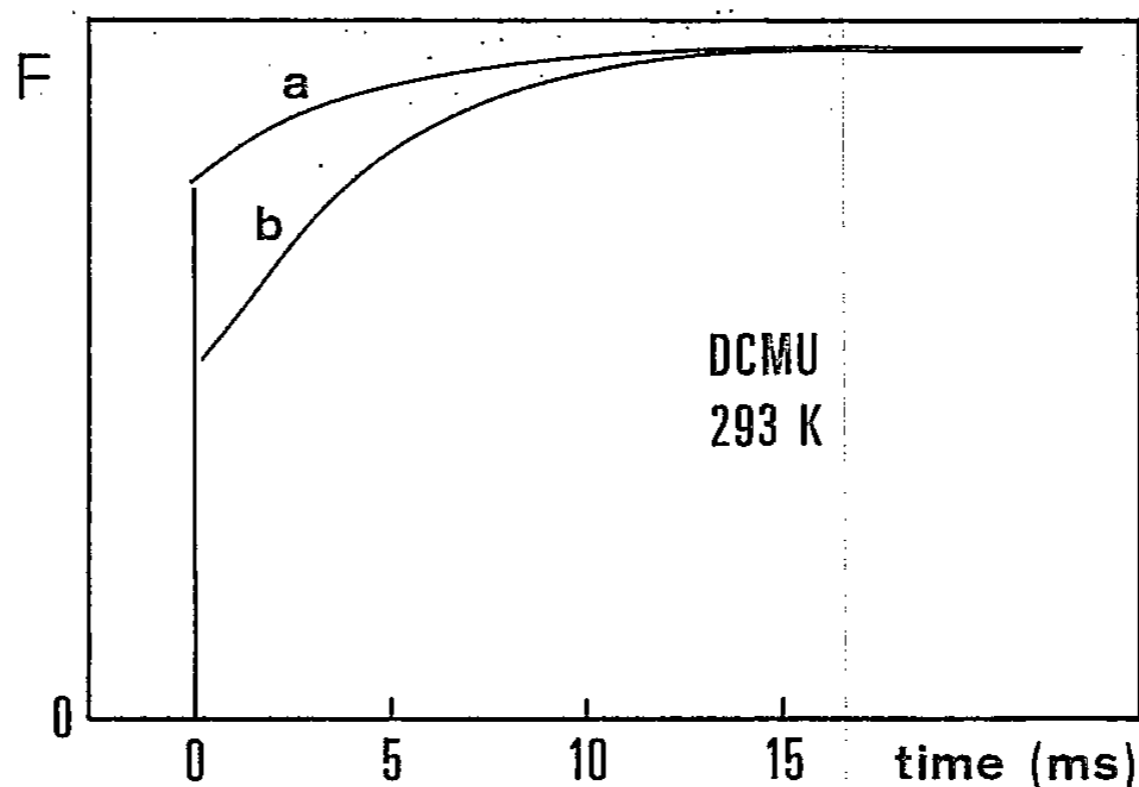


Fig. 4. — 293 K fluorescence kinetics of 2-day-old bean leaves illuminated for 8 hrs. (A) and 10 hrs. (B) and incubated with DCMU for 15 min.

Fig. 4. — Cinétiques de fluorescence à 298 K de feuilles illuminées durant 8 h (A) et 10 h (B) et incubées avec du DCMU (15 mn) avant l'enregistrement.

of the 77 K fluorescence variations progressively increases for longer greening times (Fig. 2, c, d). The fluorescence shift from 673 to 683 nm observed during this period must coincide with the incorporation of chlorophyll molecules in  $PS_{II}$  reaction centres ( $RC_{II}$ ) and their antenna system (pLHCP). However, a large proportion of pigment-proteins complexes remain unconnected to the native  $PS_{II}$  units. This is reflected by the relatively large amplitude of the  $F_0$  fluorescence.

Room temperature fluorescence variations appear during the second period (characterized by the persistence of a unique fluorescence band around 685 nm at 77 K). They are detected after some 4 hrs. of illumination. Their relative amplitude increases slowly (Fig. 3).

The typical "O-I-P" phases are distinguishable as soon as the amplitude of the variations is large enough to allow good resolution. This implies that electron transport is not limited to  $Q_A$  reduction in  $PS_{II}$  reaction centres. This is apparently not correlated

with any change in the shape of the 77 K fluorescence spectra since a unique 685 nm band is always observed. It must be noticed here that the  $F_0$  intensity remains high, suggesting the persistence of a large amount of chlorophyll-proteins which does not participate in energy transfer to photosynthetic reaction centres.

The relative  $F_0$  intensity decreases dramatically during the third period (Fig. 3). This indicates the progressive incorporation of "free" chlorophyll into  $PS_{II}$  units which is also reflected in the development of the 695 fluorescence band at 77 K. The development of the 735 nm band of  $PS_I$  during the same period suggests the parallel accumulation in  $PS_I$  units (Fig. 1, e).

When leaves are incubated with DCMU ( $10^{-5}$  M) the 293 K fluorescence kinetics only show the photochemical phase corresponding to the rapid accumulation of electrons on  $Q_A$  [13] due to the displacing of  $Q_B$  by DCMU [14] (Fig. 4).

Before the 9th hour of greening the shape of the kinetics is exponential (Fig. 4, a) but after this time a sigmoidicity appears (Fig. 4, b) as  $F_0$  decreases, indicating that energy transfer between  $PS_{II}$  units occurs [9].

Although our results constitute only a first, semi-quantitative approach to the greening mechanism of very young leaves, they show that the ontogenesis of the photosynthetic apparatus proceeds with a time-course similar to or slightly faster than in older, etiolated leaves as reported in pea by Thorne and Boardman (1971) or in bean by Franck *et al.* (1984) and Bertrand *et al.* (1988).

F. Franck is Research Associate of the Belgian National Fund for Scientific Research.

Note remise le 24 septembre 1990, acceptée après révision le 19 septembre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S. W. THORNE and N. K. BOARDMAN, *Plant. Physiol.*, 47, 1971, pp. 252-261.
- [2] N. K. BOARDMAN, J. M. ANDERSON and D. J. GOODCHILD, In *Current Research in Bioenergetics*, D. R. SANADI and L. P. VERNON Eds., Academic Press, 1978, pp. 35-109.
- [3] J. M. WHATLEY, *New Phytol.*, 78, 1977, pp. 407-420.
- [4] C. SIRONVAL, M. BROUERS, J.-M. MICHEL and Y. KUYPER, *Photosynthetica*, 2, 1968, pp. 268-287.
- [5] B. SCHOEFS, *Mémoire de licence*, Laboratory of Photobiology (B22), University of Liège, Belgium, 1990.
- [6] S. MANDOLI and W. BRIGGS, *Pour la Science*, 84, 1984, pp. 102-111.
- [7] M. JOUY, *Photosynthetica*, 16, 1982, pp. 123-128.
- [8] N. MURATA, *Biochem. Biophys. Acta*, 162, 1968, pp. 106-126.
- [9] G. DUBERTRET and P. JOLIOT, *Biochem. Biophys. Acta*, 357, 1974, pp. 399-411.
- [10] N. N. LEBEDEV and I. V. BARSKAYA, *F.E.B.S. Lett.*, 255, 1989, pp. 248-252.
- [11] B. SCHOEFS and F. FRANCK, In *Current Research in Photosynthesis*, M. BALTSCHIEFFSKY Ed., Kluwer Acad Publ., III, 1990, pp. 755-758.
- [12] N. I. MINKOV, C. SUNDQVIST and M. RYBERG, *Photosynthetica*, 23, 1989, pp. 306-313.
- [13] A. P. G. M. THIELEN and H. J. VAN GORKOM, In *Photosynthesis*, G. AKOYUNOGLU Ed., II, Balaban Int Ser, 1981, pp. 57-64.
- [14] J. B. MARDER and J. BARBER, *see ref.* [11], I, 1990, pp. 307-310.
- [15] C. SIRONVAL, F. FRANCK, R. GYSEMBERG, B. BEREZA and E. DUJARDIN, In *Photochlorophyllide reduction and greening*, C. SIRONVAL and M. BROUERS Eds., Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, 1984, pp. 197-222.
- [16] M. BERTRAND, B. BEREZA and E. DUJARDIN, *Z. Naturforsch.*, 43c, 1988, pp. 443-448.

B. S. and F. F. : *Laboratoire de Photobiologie (B22),  
Université de Liège, 4000 Liège, Belgique ;*

B. S. : *New Adress : Laboratoire de Cytophysiologie végétale et de Phycologie,  
Université des Sciences et des Techniques de Lille-Flandre-Artois, 59655 Villeneuve-d'Ascq.*



## Mise en évidence de l'effet excitateur de l'efférence thalamo-subthalamique issue du noyau parafasciculaire

Jean FÉGER et Mireille MOURoux

**Résumé** — Le noyau subthalamique reçoit une projection issue d'une structure intralaminare du thalamus, le noyau parafasciculaire. Son effet synaptique a été étudié par enregistrement extracellulaire de l'activité unitaire des neurones du noyau subthalamique. La réponse complexe obtenue après stimulation électrique du noyau parafasciculaire comporte une excitation initiale et des composantes tardives. Ces dernières disparaissent après lésion du globus pallidus et section des projections corticales passant par la capsule interne. Ainsi l'excitation initiale qui n'est pas affectée par ces lésions, est attribuable à la seule mise en jeu de la projection thalamo-subthalamique. Étant donné qu'une stimulation pharmacologique continue par microinjection de carbachol au niveau du noyau parafasciculaire entraîne un accroissement prolongé du rythme de décharge des neurones du noyau subthalamique, on peut conclure que cette voie contribue au maintien de l'activité tonique de cette structure.

### The excitatory effect of the parafascicular nucleus projection to the subthalamic nucleus in the rat

**Abstract** — The synaptic effect of the projection from an intralaminar thalamic structure, the parafascicular nucleus, to the subthalamic nucleus was investigated through extracellular recordings of subthalamic unit activities. Electrical stimulation of the parafascicular nucleus caused a complex response with two successive excitatory phases. The first excitaton was assumed to be monosynaptically driven since it was not affected by pallidal lesion or transection of the internal capsule. Pharmacological activation of the parafascicular neurons through microinjections of carbachol elicited a prolonged increase in the subthalamic discharge rate. These results suggest that the intralaminar parafascicular nucleus contributes to the activation of subthalamic neurons.

**Abridged English Version** — The subthalamic nucleus is a crucial component in the functional organization of the basal ganglia ([1] à [4]) and exerts an excitatory influence on the basal ganglia output nuclei, entopeduncular nucleus and substantia nigra pars reticulata ([5], [6], [7]). A thalamic projection to the subthalamic nucleus arises from an intralaminar thalamic structure, the parafascicular nucleus. This projection, present in the primates ([8], [9]) was first indicated by anterograde autoradiographic data in the cat ([10], [11]) and rat ([11], [12]), and its topographic organization more precisely described recently [13]. Electron microscopic autoradiography experiments demonstrated asymmetric axon terminals made by thalamic endings on subthalamic neurons ([12]).

Electrophysiological experiments were designed here to answer two questions : does parafascicular projection have an excitatory effect on subthalamic neurons? Does it tonically drive the subthalamic discharge rate? These experiments were performed on the rat, anaesthetized with ketamine (100 mg/kg, IP). Single subthalamic neuron activities were extracellularly recorded. In experiments performed on unlesioned rats, single shock electrical stimulation of the parafascicular nucleus induced a complex response in 25 of the 30 subthalamic neurons tested. This response consisted of an initial excitatory phase with a single spike. This early response had a mean latency of  $3.7 \pm 0.2$  ms (Fig. 1) and could follow high frequency stimulation. A second excitatory phase began after a delay of 9 to 15 ms. Dot-display representation well illustrated a depression of spike activity between the two excitatory phases and after the second excitatory response (Fig. 1 C). The involvement of structures such as the cerebral cortex, striatum and globus pallidus could explain the complex feature of this

Note présentée par Pierre BUSER.

response since these structures receive afferents from the intralaminar thalamic nuclei ([8], [9], [10], [14], [15], [16]) and are directly or indirectly related to the subthalamic nucleus ([2], [8], [17], [18]). In order to check this hypothesis, experiments were performed on 5 rats with their internal capsule cut by a hemitranssection in frontal plane anterior 8, rostral to the subthalamic nucleus, and on 4 rats with a chronic lesion of the globus pallidus, induced by a microinjection of quinolinic acid (60 nmol in 0.8  $\mu$ l), an axon-sparing neurotoxin [19]. In these conditions, only the early excitation remained in response to the parafascicular stimulation. In another experiment, parafascicular neurons were stimulated through microinjection of a stable cholinergic agonist, carbachol (0.11  $\mu$ mol in 200 nl injected over 1 min.) to avoid uncontrolled activation of the fibres running close to or through this structure. A progressive increase in subthalamic neuronal activity began about 2 min. after the end of the injection to then reach a plateau level after 3-5 min. with a mean increase in the discharge rate of  $105 \pm 14\%$ .

The short delay excitatory response observed after electrical stimulation (always less than 5 ms) and its ability to follow repetitive high frequency stimulation (150 to 250 Hz), are in good agreement with a monosynaptically driven excitatory effect. The involvement of a thalamo-cortico-subthalamic pathway ([14], [17], [18]) could be rejected since section of the cortical efferents at level of the internal capsule did not suppress this early excitation. The fact that the delayed excitation disappeared in rats with pallidal lesions means that this response is probably related to a disinhibition of subthalamic neurons. This implies the sequential involvement of excitatory thalamo-striatal neurons ([19], [20]), then the inhibitory striato-pallidal and pallido-subthalamic pathways [8]. The prolonged increase in discharge rate after carbachol microinjection demonstrates that the parafascicular nucleus is able to drive the spiking activity of subthalamic neurons. More generally, this projection from an intralaminar thalamic structure to the subthalamic nucleus may convey limbic information to the indirect pathway joining the striatum to the basal ganglia output structures, namely pars reticulata of the substantia nigra and entopeduncular nucleus or internal globus pallidus.

---

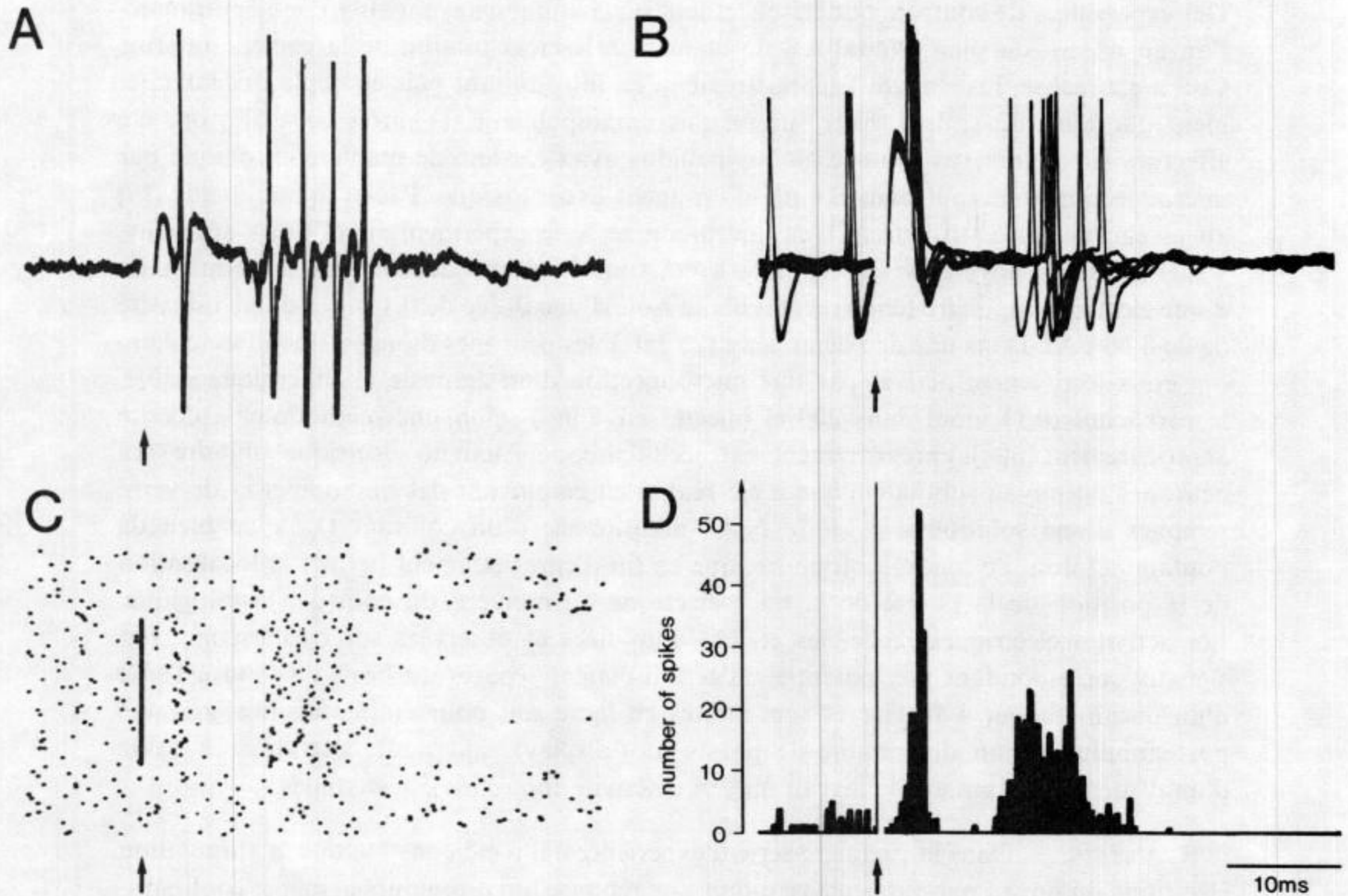
INTRODUCTION. — Le noyau subthalamique est inclus dans le circuit indirect striato-pallido-subthalamique qui relie le striatum aux sorties des ganglions de la base, la pars reticulata de la substance noire et le segment interne du globus pallidus ou noyau entopédunculaire des rongeurs ([1], [2], [8]). Par le jeu d'une transmission glutamatergique excitatrice, il assure le maintien de l'activité tonique des neurones de ces deux dernières structures ([6], [7]). Ainsi, il s'oppose à l'action inhibitrice de la voie directe striato-nigrale et striatopallidale. En conséquence, son rôle est reconnu comme déterminant dans le fonctionnement des ganglions de la base en conditions normales ou pathologiques ([1] à [4]). Les principales afférences au noyau subthalamique comprennent des voies excitatrices issues de diverses aires corticales ([17], [18]) et la projection inhibitrice pallido-subthalamique ([8]). Comme l'existence d'une projection issue de la partie intralaminare du thalamus, le noyau parafasciculaire ([8] à [12]) a été récemment confirmée [13], il a paru intéressant de déterminer l'effet synaptique de cette projection.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Cette expérimentation a été réalisée sur des rats mâles (260-340 g, Wistar, élevage Depré, France). Après anesthésie (Imalgène I.F.F.A.-Mérieux, 100 mg/kg IP, renouvelée au cours d'expérimentation), la tête des animaux est fixée en conditions stéréotaxiques [20]. La température de l'animal est maintenue à  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Des expériences de contrôle ont été effectuées sur 5 animaux ayant subi une hémitranssection au niveau du plan frontal A 8 de manière à léser la totalité de la capsule interne. Ceci a été réalisé, juste avant l'enregistrement, en introduisant puis en déplaçant latéralement une lame de scalpel, fixée sur un micromanipulateur. D'autres contrôles ont été effectués sur 4 animaux dont le globus pallidus avait été lésé de manière chronique par microinjection (60 nmol dans 0,8  $\mu$ l) d'un agent excitotoxique, l'acide quinolinique [19] au niveau de cette structure. Dans une première série expérimentale (10 rats normaux, 9 rats lésés), le noyau parafasciculaire a été stimulé électriquement par l'intermédiaire d'une électrode bipolaire (choc rectangulaire isolé d'une durée de 0,1 ms et d'une intensité de 20 à 60  $\mu$ A). Dans une deuxième série (25 rats), les neurones du noyau parafasciculaire ont été sélectivement activés par une microinjection d'un agoniste cholinergique stable, le carbachol (0,11  $\mu$ mol dans 200 nl injectés en 1 mn) selon une méthodologie décrite antérieurement [6]. L'enregistrement extracellulaire de l'activité électrique unitaire des neurones du noyau subthalamique a été réalisé en employant des micropipettes de verre remplies d'une solution à 1 M de NaCl additionnée d'un colorant (1 % de bleu de pontamine) dont l'éjection iontophorétique en fin d'enregistrement permet la localisation de la position de la pointe de la microélectrode au moment du contrôle histologique. Les activités électriques recueillies étaient amplifiées et observées sur oscilloscope. Les signaux correspondant aux potentiels d'action étaient séparés du bruit de fond à l'aide d'un discriminateur à fenêtre et sont traités en ligne soit pour établir un histogramme post-stimulus ou un diagramme de points (dot-display), soit pour déterminer à l'aide d'un dispositif intégrateur le niveau moyen d'activité toutes les dix secondes.

**RÉSULTATS.** — Dans la première série d'expériences, il a été constaté que la stimulation électrique du noyau parafasciculaire induit une réponse qui a toujours la même configuration dans la très grande majorité des cellules enregistrées dans le noyau subthalamique (25 neurones sur 30) : une première phase d'excitation avec un potentiel d'action isolé dont la latence moyenne est de  $3,7 \pm 0,2$  ms, suivie d'une bouffée de 2 à 5 potentiels d'action, avec une latence moyenne de  $11,8 \pm 0,5$  ms (*fig. 1 A et B*). La première réponse peut suivre des stimulations répétées (train de 3 ou 4 chocs avec une fréquence interne de 150 à 250 Hz). Enfin la présentation en dot-display met en évidence un premier arrêt d'activité des neurones du noyau subthalamique entre les deux périodes d'activation puis un second pendant une durée de 70 à 130 ms (*fig. 1 C*). Dans les expériences réalisées sur des animaux dont la capsule interne avait été sectionnée au niveau du globus pallidus, seule la réponse initiale d'excitation était encore observable (9 cellules) après stimulation du noyau parafasciculaire. Il en a été de même lorsque cette stimulation était effectuée sur des animaux n'ayant subi qu'une lésion chronique du globus pallidus (7 cellules). Enfin, dans la série expérimentale comportant une stimulation pharmacologique des neurones du noyau parafasciculaire, l'injection de carbachol a provoqué un accroissement d'activité pour toutes les cellules retenues ( $n=8$ ), sous réserve des conditions suivantes : injection bien centrée dans le noyau parafasciculaire, enregistrement réalisé pendant au moins 25 mn, contrôle histologique de la localisation subthalamique de la cellule. L'augmentation du rythme débutait une à deux minutes après la fin de l'injection et atteignait sa valeur maximale au bout de 5 mn. L'accroissement moyen a été de  $105 \pm 14$  %.

**DISCUSSION.** — Dans cette étude préliminaire, il est donc montré que la stimulation électrique du noyau parafasciculaire provoque une réponse complexe des neurones du



Réponses enregistrées au niveau du noyau subthalamique après stimulation électrique isolée du noyau parafasciculaire (chaque image correspond à un neurone différent mais les bases de temps sont identiques) : enregistrement oscillographique direct d'une (A) et de cinq réponses superposées (B) montrant la faible variabilité de la latence de la réponse initiale, caractère aussi illustré par un histogramme post-stimulus obtenu avec 128 stimulations successives (D); représentation en diagramme de points qui illustre les deux phases d'excitation et d'arrêt de l'activité des neurones du noyau subthalamique produites par la stimulation thalamique, séquence marquée par la barre, encadrée par un enregistrement initial et un autre final, de passages successifs d'activité spontanée.

*Examples of extracellularly recorded responses in the subthalamic nucleus after single shock parafascicular electrical stimulation (arrows). Each panel corresponds to a different neuron: A. Oscilloscopic record to show early excitation with a single action potential followed by a burst of spikes. B. Superimposition of five successive responses to illustrate the very small latency variability of the earlier response. C. Dot-display: sweeps of spontaneous activity were recorded before and after the period of stimulation (indicated by a bar). Notice the depression of neuronal activity between the two excitatory phases and after the second one. D. Post-stimulus histogram obtained with 128 successive stimulations (bin width 0.4 ms).*

noyau subthalamique. Sa composante initiale d'activation résulte très probablement de la mise en jeu de la relation monosynaptique correspondant à la projection thalamo-subthalamique décrite anatomiquement et caractérisée morphologiquement par l'aspect asymétrique de ses terminaisons synaptiques au niveau du noyau subthalamique, critère qualifiant une jonction excitatrice [12]. En effet, bien que cette réponse ait été enregistrée en condition extracellulaire, sa nature monosynaptique est nettement suggérée par la faible variabilité de sa latence et sa capacité à suivre des stimulations de fréquence élevée. La mise en jeu d'un réflexe d'axone dans l'hypothèse où les projections thalamiques et

subthalamiques proviendraient des mêmes neurones corticaux, ou d'une relation disynaptique thalamo-cortico-subthalamique ne peut pas être retenue puisque cette réponse d'excitation subsiste après section de la capsule interne. De plus, la valeur moyenne de la latence observée est nettement inférieure à celle (8,6 ms) qui a été signalée pour des réponses d'excitation obtenue par enregistrement extracellulaire au niveau du noyau subthalamique [18]. La bouffée de potentiels observée au cours de la deuxième phase d'activation est produite par mise en jeu d'un circuit indirect. Puisque cette réponse tardive disparaît après lésion chronique du globus pallidus, on peut proposer l'hypothèse suivante : comme les noyaux intralaminaires du thalamus projettent également sur le striatum ([8], [15]), en produisant une excitation [19], la stimulation de la voie thalamo-striatale provoque un accroissement de l'effet inhibiteur de la projection striato-pallidale, ce qui diminue l'activité des neurones pallidiaux. Ceci entraîne alors une désinhibition du noyau subthalamique.

Les expérimentations comportant des microinjections ont permis de stimuler sélectivement les neurones du noyau parafasciculaire sans affecter les éléments axoniques passant à l'intérieur de cette structure ou en son voisinage ainsi que cela a été employé dans une autre expérimentation portant sur les ganglions de la base ([6], [7]). Le choix d'un agoniste cholinergique, le carbachol, a été motivé par la description de voies ayant une nature cholinergique parmi les afférences réticulo-thalamiques aboutissant au noyau parafasciculaire [22]. Par ailleurs, des microinjections de concentration et de volume comparables réalisées au niveau du noyau parafasciculaire s'étaient révélées efficaces dans une expérimentation précédente où étaient étudiés les effets de la stimulation du noyau parafasciculaire sur la circulation sanguine cérébrale [23]. Le fait que ce mode de stimulation entraîne un accroissement soutenu de l'activité des neurones du noyau subthalamique paraît démontrer que la sommation des effets excitateurs directs ou indirects en relation avec l'activation du noyau parafasciculaire est nettement supérieure à celle des composantes inhibitrices.

*En conclusion*, ces premiers résultats permettent d'attribuer un caractère excitateur à la projection thalamo-subthalamique et montrent que le noyau parafasciculaire contribue au maintien de l'activité tonique des neurones du noyau subthalamique. Enfin, ils suggèrent que le noyau subthalamique pourrait intervenir non seulement dans des activités motrices mais aussi dans d'autres activités en relation avec le système limbique.

Ce travail a bénéficié de l'aide de l'I.N.S.E.R.M. (C.R.E. 910804). Les auteurs remercient vivement E. Dehaussé (I.N.S.E.R.M. U. 161) pour la réalisation des illustrations.

Note remise le 23 septembre 1991, acceptée le 26 septembre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. L. ALBIN, A. B. YOUNG et J. B. PENNEY, *Trends in Neurosci.*, 12, 1989, p. 366-375.
- [2] G. E. ALEXANDER et M. D. CRUTCHER, *Trends in Neurosci.*, 13, 1990, p. 266-271.
- [3] R. R. DELONG, *Trends in Neurosci.*, 13, 1990, p. 281-285.
- [4] H. BERGMAN, T. WICHMANN et M. R. DELONG, *Science*, 249, 1990, p. 1436-1438.
- [5] S. T. KITAI et H. KITA, in M. B. CARPENTER et A. JARAMAYAN éd., *The basal ganglia II-Structure and function: Current concepts*, Plenum Press, New York, 1987, p. 357-373.
- [6] P. ROBLEBO et J. FÉGER, *Brain Res.*, 518, 1990, p. 47-54.
- [7] J. FÉGER, P. ROBLEDO et N. RENWART, *In the Basal Ganglia III*, G. BERNARDI, M. B. CARPENTER et G. DI CHIARA éd., Plenum Press, New York, 1990, p. 99-108.
- [8] A. PARENT, 1986 *Comparative neurobiology of the basal ganglia*, J. Wiley and sons, New York, p. 335.



- [9] A. PARENT, *Trends in Neurosci.*, 13, 1990, p. 254-258.
- [10] G. J. ROYCE et R. J. MOUREY, *J. Comp. Neurol.*, 235, 1985, p. 277-300.
- [11] T. SUGIMOTO, T. HATTORI, N. MIZUNO, K. ITOH et M. SATO, *J. Comp. Neurol.*, 214, 1983, p. 209-216.
- [12] T. SUGIMOTO et T. HATTORI, *Brain Res.*, 264, 1983, p. 335-339.
- [13] H. W. BERENDSE et H. J. GROENEWEGEN, In G. BERNARDI M. B. CARPENTER et G. DI CHIARA, *The Basal Ganglia III, Structure and function*, Plenum Press, New York, 1991, p. 89-98.
- [14] M. BENTIVOGLIO, C. MACCHIAND et A. ALABANESE, *Neurosci. Lett.*, 26, 1981, p. 5-10.
- [15] L. DUBÉ, A. D. SMITH et J. P. BOLAM, *J. Comp. Neurol.*, 267, 1988, p. 455-471.
- [16] A. F. SADIKOT, A. PARENT et C. FRANÇOIS, *Brain Res.*, 510, 1990, p. 161-165.
- [17] S. T. KITAI et J. M. DENIAU, *Brain Res.*, 214, 1981, p. 411-415.
- [18] B. ROUZAIRE-DUBOIS et E. SCARNATI, *Neuroscience*, 15, 1985, p. 69-79.
- [19] R. SCHWARCZZ, W. O. WHETSELL et R. M. MANGANO, *Science*, 219, 1983, p. 316-318.
- [20] C. J. WILSON, H. T. CHANG et S. T. KITAI, *Exp. Brain Res.*, 51, 1983, p. 217-226.
- [21] G. PAXINOS et C. WATSON, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd éd., Acad. Press, Sydney, 1986, p. 262.
- [22] K. SEMBA, P. B. REINER et H. C. FIBIGER, *Neuroscience*, 38, 1990, p. 643-654.
- [23] S. MRAOVITCH, J. FÉGER, Y. CALANDO et J. SEYLAZ, In J. SEYLAZ and E. T. MCKENZIE éd., *Neurotransmission and cerebrovascular function*, I, Elsevier Sci. Pub. Amsterdam, 1989, p. 397-400.

---

*Laboratoire de Pharmacologie, Faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques,  
Université René-Descartes, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris.*

## Effets du gel sur la peroxydation des lipides membranaires de racines de Rhododendron (Rhododendron cv. Jean-Marie de Montaguë)

Muriel LOUBARESSE, André PAULIN et Jean DEREUDDRE

**Résumé** – Les racines de rhododendron préalablement endurcies 40 jours et soumises à des refroidissements par paliers successifs allant de 0 à  $-15^{\circ}\text{C}$  suivis de réchauffements à  $+20^{\circ}\text{C}$ , présentent des teneurs en phospholipides et galactolipides constamment supérieures à celles observées pour les racines non endurcies. On constate en particulier, des teneurs plus élevées en acide phosphatidique, en phosphatidylcholine et digalactosyldiacylglycérol. Au cours de l'abaissement de température et à l'issue du réchauffement, on note une accumulation d'acide phosphatidique tandis que la phosphatidylcholine et le digalactosyldiacylglycérol diminuent. Les taux de peroxydes et de malondialdéhyde s'accroissent fortement attestant une forte activité de dégradation des lipides membranaires.

### Effects of freezing on membrane lipid peroxidation of Rhododendron roots (Rhododendron cv. Jean-Marie de Montaguë)

**Abstract** – After freeze-thaw cycles, phospholipid and galactolipid levels in roots cold-acclimated for 40 days were higher than in non-acclimated roots. In particular, levels of phosphatidic acid, phosphatidylcholine and digalactosyldiacylglycerol were higher. Phosphatidic acid accumulated in the frozen tissue while phosphatidylcholine and digalactosyldiacylglycerol decreased. Peroxide and malondialdehyde levels increased after freezing and thawing, demonstrating peroxidation of membrane lipids.

**Abridged English Version** – During cold acclimation of rhododendron roots (Rhododendron cv. Jean-Marie de Montaguë), the levels of membrane phospholipids and galactolipids increased; in particular, increases were noted in phosphatidylcholine (PC) and in digalactosyldiacylglycerol (DGDG). These increases were accompanied by a rise in unsaturation of fatty acid chains ([1], [2]). It is known that membranes are the primary site of freezing injury which induces lipid catabolism [3] and accelerates lipid peroxidation [4]. We have examined the influence of freezing temperature from 0 to  $-15^{\circ}\text{C}$  on phospholipid and galactolipid levels and on lipid peroxidation after thawing at  $+20^{\circ}\text{C}$  in cold-acclimated and non-acclimated rhododendron roots.

Two-year-old rhododendrons grown in containers were kept in climatic chambers at  $+20^{\circ}\text{C}$  with a relative humidity of 0.60 and a 16-hrs. photoperiod of light intensity  $93 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Non-acclimated plants were kept permanently under these conditions. After one month the plants were transferred for 40 days to a cold-hardening cabinet using a day temperature of  $10^{\circ}\text{C}$ , a night temperature of  $5^{\circ}\text{C}$ , and a relative humidity of 0.60. Plants were frozen using daily  $5^{\circ}\text{C}$  decrements from 0 to  $-15^{\circ}\text{C}$ . At selected temperatures, they were thawed for 24 hrs. at  $+20^{\circ}\text{C}$ , after which roots were isolated, and the different analyses effected. Each assay was performed in triplicate.

Lipids were extracted and assayed at each temperature according to the methods of Bligh and Dyer [5]. Phospholipids and galactolipids were separated by thin-layer chromatography as described by Lepage [6] and transmethylated according to Metcalfe *et al.* [7]. Methylated fatty acid esters were analysed on a Girdel type 30 gas chromatograph using a carbowax column 0.32 mm in diameter and 25 m long at  $165^{\circ}\text{C}$ . The carrier gas was helium.

Note présentée par Alexis MOYSE.

Extracted lipids were assayed according to the method of Bligh and Dyer [5], and the peroxide index was measured according to the method of Koch *et al.* [8]. Malondialdehyde (MDA) was measured according to Heath and Parker [9].

After 40 days of cold-hardening, phospholipid and galactolipid levels increased respectively by 49 and 56% (*Fig. 1A and 1B*). Phospholipid and galactolipid levels in cold-acclimated roots and in non-acclimated roots decreased after each freeze-thaw cycles.

Phosphatidic acid (PA) and phosphatidylcholine (PC) levels remained higher in cold-acclimated roots after freezing (*Fig. 2A and 2B*). With acclimated roots the rise in PA was observed at the beginning of the assay; with non-acclimated roots, it occurred between  $-5$  and  $-10^{\circ}\text{C}$ . In all cases, phosphatidylcholine (PC) decreased (*Fig. 2B*). Furthermore, digalactosyldiacylglycerol (DGDG) levels were always higher after freezing with cold-acclimated roots (*Fig. 3*), and decreased from 0 to  $-15^{\circ}\text{C}$  in acclimated and non-acclimated roots.

Linoleic acid (C18:2) and linolenic acid (C18:3) levels in phospholipids and galactolipids (*Table*) were maintained higher in cold-acclimated roots.

Peroxide and malondialdehyde levels increased sharply after freezing and thawing (*Fig. 4A and 4B*), but a slowdown was observed with cold-acclimated roots.

Freezing and thawing injuries were accompanied by an accumulation of phosphatidic acid in rhododendron root cells (*Fig. 2A*). This process was indicated by a high activity of phospholipase D when the tissue was frozen, as has been seen by Horwath *et al.* [10], Kuiper [11], Sikorska and Kacperska [12], Yoshida and Sakai [13]. The last three authors proposed that phospholipase D activity was dependent on the degree of cold acclimation. Our results revealed greater degradation of phosphatidylcholine (PC) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG) in non-acclimated roots (*Figs. 2B and 3*). During cold acclimation, phospholipid and galactolipid levels in rhododendron roots increased [1]. These high levels of polar lipids were maintained during freeze-thaw cycles in cold-acclimated roots (*Fig. 1A and 1B*). The supply to the membranes may be correlated with a greater resistance of rhododendron roots. In particular, the increases in PC and DGDG noted here are known to play an important role in cold hardening and furthermore in freezing resistance ([1]-[3]). According to Kuiper [11], the excess of PC in cold-hardened tissue counterbalances the phospholipase D activity and moderates the decrease of unsaturation (*Table*). When plants were kept under normal growth conditions, peroxide and malondialdehyde (MDA) levels in the roots (*Fig. 4A and 4B*) increased after freezing, and seemed to be correlated with marked catabolism of polar lipids. In contrast, with cold acclimation, lipid peroxidation was moderated. According to several authors, cold acclimation may attenuate lipid peroxidation [4], perhaps, as Spsychalla and Desborough have suggested [14] by a decrease in free radical content.

Before hardening, with acclimated rhododendron roots, some of the transformations implicated in the loss of membrane integrity, such as lipid degradation, would be delayed.

---

INTRODUCTION. — Au cours de l'acclimation au froid de racines de rhododendron (*Rhododendron* cv. Jean-Marie de Montaguë), on observe un accroissement des phospholipides et des galactolipides membranaires, en particulier, une augmentation de phosphatidylcholine (PC) et de digalactosyldiacylglycérol (DGDG) [1]. Parallèlement, un accroissement du taux d'insaturation des chaînes d'acides gras est mis en évidence [1]. On sait que l'action du gel s'exerce de manière privilégiée au niveau membranaire par une dégradation des lipides ([2], [3]) et de ce fait, accélère les peroxydations lipidiques [4].

Il nous a paru intéressant de comparer l'évolution des lipides polaires et de la peroxydation lipidique membranaire de racines de rhododendron endurcies et non endurcies, au cours de refroidissements par paliers successifs de 24 h allant de 0 à  $-15^{\circ}\text{C}$  suivis de réchauffements de même durée à  $+20^{\circ}\text{C}$ .

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — Des rhododendrons (*Rhododendron* cv. Jean-Marie de Montaguë) âgés de 2 ans, cultivés en conteneurs sont, dès leur arrivée au laboratoire, entreposés en enceintes climatiques à  $20^{\circ}\text{C}$ , humidité relative 0,60 pour une photopériode de 16 h (éclairage :  $93 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), durant 1 mois. A l'issue de ce prétraitement, l'endurcissement des plants est réalisé avec 8 h de lumière et 16 h d'obscurité respectivement à 10 et  $5^{\circ}\text{C}$  dans les mêmes conditions d'éclairage et d'humidité relative. L'endurcissement dure 40 jours. Les plantes non endurcies sont placées en permanence dans les conditions du prétraitement.

Le refroidissement (plantes non endurcies et endurcies) est réalisé par paliers successifs de 24 h à 0,  $-5$ ,  $-10$  et  $-15^{\circ}\text{C}$ ; chacun de ces séjours étant suivi d'un réchauffement à  $+20^{\circ}\text{C}$  de même durée à l'issue duquel les analyses sont effectuées. Trois plantes sont prélevées pour chaque dosage.

**Analyse des lipides.** — Les trois plantes prélevées sont traitées indépendamment : le système racinaire est débarrassé de sa terre, sectionné et rincé à l'eau distillée. Il est ensuite congelé dans l'azote liquide puis lyophilisé en vue de l'analyse des lipides membranaires. Les lipides sont extraits par un mélange chloroforme/méthanol (5/5, v/v) selon la méthode de Bligh et Dyer [5]. Les phospholipides et les galactolipides sont séparés par chromatographie sur couche mince par la méthode de Lepage [6] et transméthylés selon la technique de Metcalfe et coll. [7]. Les esters méthylés des acides gras sont dosés par chromatographie en phase gazeuse (Girdel type 30) sur une colonne capillaire de Carbowax de 0,32 mm de diamètre et de 25 m de long à  $165^{\circ}\text{C}$ . Le gaz vecteur est l'hélium.

**Dosage du malondialdéhyde (MDA).** — Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode de Heath et Parker [9].

**RÉSULTATS.** — *Teneurs en phospholipides et galactolipides* (fig. 1A et 1B). — A l'issue d'un endurcissement de 40 jours, les teneurs initiales en phospholipides et galactolipides se sont accrues respectivement de 49 et 56%. Au cours des refroidissements et des réchauffements ultérieurs, les taux de phospholipides et de galactolipides des racines endurcies, restent, dans tous les cas, supérieurs aux teneurs des racines non endurcies. Les variations observées tout au long de l'expérience sont de faible amplitude. Qu'il

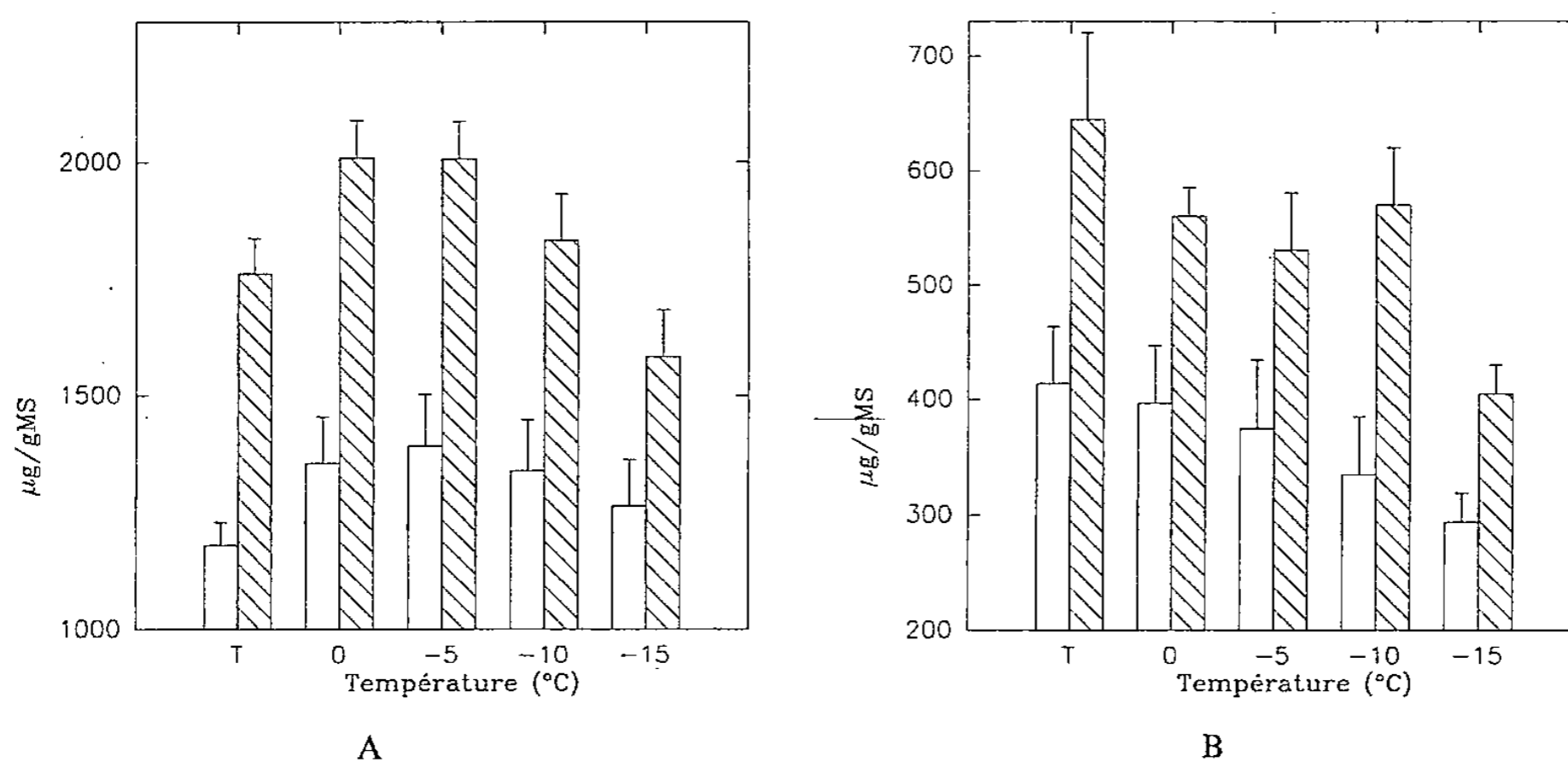


Fig. 1. — Évolution en fonction de la température des teneurs pondérales en phospholipides (fig. 1A) et en galactolipides (fig. 1B) des racines endurcies (▨) et non endurcies (□). T : température de référence avant le gel. Les barres verticales représentent l'écart type.

Fig. 1. — Changes in phospholipids (Fig. 1A) and galactolipids (Fig. 1B) with temperature in cold-acclimated roots (▨) and non-acclimated roots (□). T: reference temperature before freezing. Vertical bars represent standard deviation.

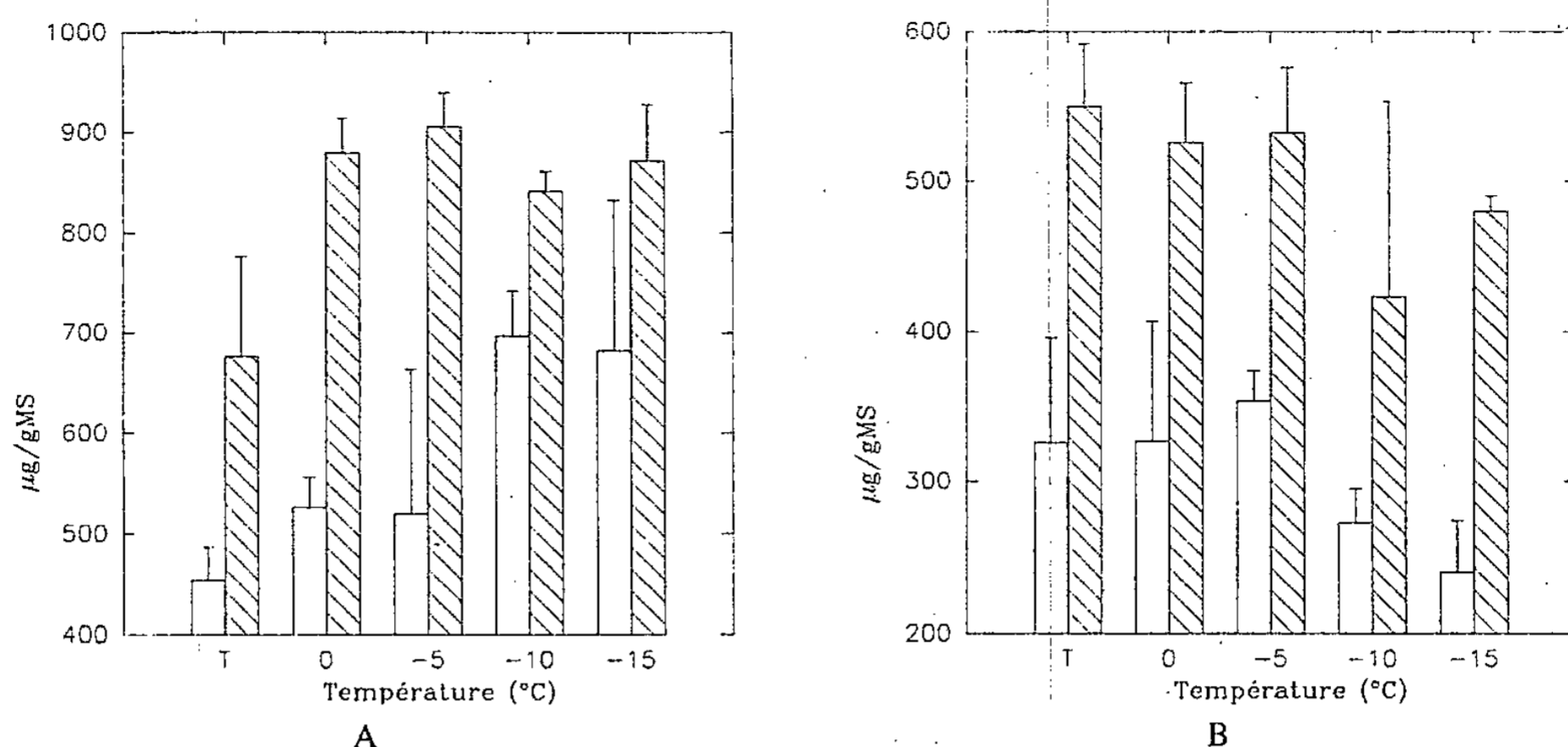


Fig. 2. — Évolution en fonction de la température, des teneurs pondérales en acide phosphatidique (fig. 2A) et en phosphatidylcholine (fig. 2B) des racines endurcies (▨) et non endurcies (□). T : température de référence avant le gel. Les barres verticales représentent l'écart type.

Fig. 2. — Changes in phosphatidic acid (Fig. 2A) and in phosphatidylcholine (Fig. 2B) with temperature in cold-acclimated roots (▨) and non-acclimated roots (□). T: reference temperature before freezing. Vertical bars represent standard deviation.

s'agisse des racines non endurcies ou endurcies, on observe une diminution de teneurs en phospholipides et galactolipides de 0 à  $-15^{\circ}\text{C}$ ; à  $-15^{\circ}\text{C}$ , celles-ci représentent respectivement 90 et 107 % des valeurs initiales pour les phospholipides et 71 et 63 % des valeurs initiales pour les galactolipides.

*Évolution des catégories lipidiques des phospholipides* (fig. 2A et 2B). — Les teneurs en acide phosphatidique (PA), phosphatidylcholine (PC), d'une part, et en phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylglycérol (PG), phosphatidylinositol (PI) non représentés ici d'autre part, des racines endurcies, sont supérieures à celles observées avec les racines non endurcies après réchauffement quel que soit l'abaissement de température. En ce qui concerne les racines endurcies, après le traitement à  $0^{\circ}\text{C}$ , un fort accroissement en PA s'observe à l'issue du réchauffement. Avec les racines non endurcies, cet accroissement intervient à plus basse température : entre  $-5$  et  $-10^{\circ}\text{C}$ . En fin d'expérience, à  $-15^{\circ}\text{C}$ , ces différences s'expriment par des teneurs égales respectivement à 129 % et 150 % des valeurs initiales.

D'une manière générale, c'est à l'issue d'un refroidissement entre  $-5$  et  $-15^{\circ}\text{C}$  que se produit la diminution du taux de PC. Après refroidissement à  $-15^{\circ}\text{C}$ , il représente respectivement 87 % des valeurs initiales pour les racines endurcies et 73,5 % des valeurs initiales pour les racines non endurcies.

Des écarts types importants peuvent s'observer pour PA et PC qui pourraient s'expliquer par des variations d'échantillonnage.

*Évolution des catégories lipidiques des galactolipides* (fig. 3). — Les teneurs en digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et en monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), des racines endurcies, (seules sont représentées les valeurs de DGDG), sont toujours supérieures à celles observées pour les racines non endurcies quelle que soit la température.

Les teneurs en DGDG, qui présentent de fortes variations individuelles, diminuent dans les deux cas avec l'abaissement de température. Après un refroidissement à  $-15^{\circ}\text{C}$ , elles représentent respectivement 64 et 66 % des valeurs initiales.

TABLEAU

Évolution en fonction de la température ( $\pm$  l'écart type) des chaînes d'acides gras des phospholipides et des galactolipides des racines endurcies et non endurcies.

*Changes in phospholipid and galactolipid fatty acid levels ( $\pm$  standard deviation) with temperature in cold-acclimated roots and non-acclimated roots.*

		Traitement	Témoin NE 20°C E 10/5°C	0°C	-5°C	-10°C	-15°C
ACIDES GRAS DES PHOSPHOLIPIDES ( $\mu\text{g/gMS}$ )	C18:2	NE	421,6 $\pm$ 30,6	413,1 $\pm$ 33,1	422,8 $\pm$ 30,0	431,2 $\pm$ 12,1	368,8 $\pm$ 11,2
		E	606,9 $\pm$ 35,9	795,6 $\pm$ 31,2	809,1 $\pm$ 40,5	683,7 $\pm$ 40,2	529,0 $\pm$ 26,3
	C18:3	NE	135,9 $\pm$ 13,0	170,7 $\pm$ 31,8	145,5 $\pm$ 58,7	82,33 $\pm$ 35,3	78,6 $\pm$ 20,1
		E	458,8 $\pm$ 30,1	425,9 $\pm$ 23,0	330,0 $\pm$ 35,6	311,8 $\pm$ 23,8	247,3 $\pm$ 16,1
ACIDES GRAS DES GALACTOLIPIDES ( $\mu\text{g/gMS}$ )	C18:2	NE	150,9 $\pm$ 55,2	101,6 $\pm$ 13,1	123,6 $\pm$ 14,8	92,3 $\pm$ 26,9	74,6 $\pm$ 6,3
		E	192,0 $\pm$ 27,5	177,1 $\pm$ 30,5	177,5 $\pm$ 18,3	177,5 $\pm$ 29,1	67,7 $\pm$ 2,8
	C18:3	NE	58,9 $\pm$ 14,4	75,8 $\pm$ 20,4	63,0 $\pm$ 20,0	58,7 $\pm$ 4,5	53,1 $\pm$ 7,3
		E	223,9 $\pm$ 54,9	190,7 $\pm$ 39,2	168,5 $\pm$ 46,7	167,2 $\pm$ 8,3	109,3 $\pm$ 9,5

*Évolution des acides gras des phospholipides et des galactolipides (tableau).* — Dans tous les cas, les teneurs en acide linoléique (C18:2) et en acide linoléique (C18:3) sont plus élevées lorsque les racines ont été endurcies (seuls sont retenus ici les résultats relatifs au C18:2 et au C18:3).

D'une manière générale, on observe une diminution de ces acides gras lorsque progresse l'abaissement de température.

*Évolution du taux de peroxydes (fig. 4A).* — Dans les deux cas, le taux de peroxydes s'accroît fortement jusqu'à  $-5^\circ\text{C}$ . Ensuite, entre  $-5$  et  $-15^\circ\text{C}$ , ce taux reste constant pour les racines endurcies alors qu'il continue de s'accroître pour les racines non endurcies. En fin d'expérience, ces teneurs représentent respectivement 330 et 350 % des valeurs initiales.

*Évolution du taux de MDA (fig. 4B).* — Le taux de MDA s'accroît dans les deux cas fortement lors de l'abaissement de la température.

DISCUSSION. — L'accumulation d'acide phosphatidique dans les cellules de racines de rhododendron, rend compte du catabolisme des lipides qui a lieu au cours des refroidissements successifs entre 0 et  $-15^\circ\text{C}$  suivis de réchauffements à  $+20^\circ\text{C}$ . Ce processus est attesté par une forte activité de la phospholipase D lorsque les tissus sont soumis à un cycle de gel-dégel comme cela a été vu par Horwath et coll. [10], Kuiper [11], Sikorska et Kacperska [12], Yoshida et Sakai [13]. Ces trois derniers auteurs constatent que la phospholipase D est d'autant moins active que l'endurcissement du végétal est plus profond; nos résultats montrent une dégradation plus intense de PC et de DGDG chez les racines non endurcies sans que l'on puisse dire si les modifications observées apparaissent au cours de la congélation ou lors du réchauffement ultérieur.

On peut penser que le fort enrichissement initial en phospholipides et galactolipides provoqué par l'endurcissement [1], permet une meilleure résistance au gel puis au dégel du système racinaire comme le montrent ici, les teneurs constamment supérieures observées avec les racines endurcies. L'augmentation des taux de PC et de DGDG connus pour être impliqués dans la résistance au froid ([1], [2]) et en particulier, selon Kuiper [11],

l'excès de PC dans les tissus à l'issue de l'endurcissement, participerait au ralentissement de la saturation corrigeant l'action de la phospholipase D.

En l'absence d'endurcissement, les taux de peroxydes et de MDA sont très élevés aux basses températures, rendant compte d'une intense dégradation des lipides polaires. A l'inverse, après acclimatation, on observe une diminution des peroxydations lipidiques. Pour certains auteurs, en effet, l'acclimatation au froid ralentirait la peroxydation des lipides [4], peut-être, comme le suggèrent Spychalla et Desborough [14] en provoquant une diminution des radicaux libres.

Ainsi, lorsque l'acclimatation au froid des racines de rhododendron est réalisée avant le gel, certaines des transformations impliquées dans la perte d'intégrité membranaire, comme la dégradation des lipides apparaissent ralenties.

Ce travail a pu être réalisé grâce à l'ONIFLHOR. Le matériel végétal nous a été généreusement fourni par les pépinières Derly au Thilliers-en-Vexin.

Note remise le 24 juin 1991, acceptée après révision le 19 septembre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. LOUBARESE et J. DEREUDDRE, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 311, série III, 1990, p. 417-423.
- [2] D. T. CLARKSON, K. C. HALL et J. K. ROBERTS, *Planta*, 149, 1980, p. 464-471.
- [3] A. SAKAI et W. LARCHER, *Frost survival of plants*, W. D. BILLINGS, F. GOLLEY, O. L. LANGE, J. S. OLSON et H. REMMERT éd., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, I.S.B.N. 3-540-17332-3, 2, 1987, p. 39-58.
- [4] V. K. ZIROV et M. N. MERZLYAK, *Plant Sci. Letters*, 30, 1983, p. 185-191.
- [5] F. BLIGH et W. DYER, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 937, 1959, p. 911-917.
- [6] M. LEPAGE, *J. Chromatogr.*, 13, 1964, p. 99-103.
- [7] L. METCALFE, A. SCHMITZ et A. PELKA, *Anal. Chem.*, 38, 1966, p. 514-515.
- [8] R. B. KOCH, B. STERR et C. C. FERRAU, *Arch. Biochem. Biophys.*, 78, 1958, p. 165-179.
- [9] R. HEATH et L. PARKER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125, 1968, p. 189-198.
- [10] I. HORWATH, L. VIGH, A. BELEA et T. FARKAS, *Physiol. Plant.*, 45, 1979, p. 57-62.
- [11] P. J. C. KUIPER, *Physiol. Plant.*, 64, 1985, p. 118-122.
- [12] E. SIKORSKA et A. KACPERSKA, *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*, J. F. G. M. WINTERMANS et P. J. C. KUIPER éd., Elsevier Biomedical Press, B. V. Amsterdam, New York, Oxford, I.S.B.N., 0-444-80457-9, 8, 1982, p. 415-418.
- [13] S. YOSHIDA et A. SAKAI, *Plant Physiol.*, 53, 1974, p. 509-511.
- [14] J. P. SPYCHALLA et S. L. DESBOROUGH, *Plant Physiol.*, 94, 1990, p. 1214-1218.

M. L., A. P. et J. D. : *Laboratoire de Physiologie des Organes végétaux après Récolte*, C.N.R.S.,  
4 ter, route des Gardes, 92190 Meudon;

M. L. et J. D. : *Laboratoire de Cryobiologie végétale*, Université Pierre-et-Marie-Curie,  
12, rue Cuvier, 75230 Paris Cedex 05.

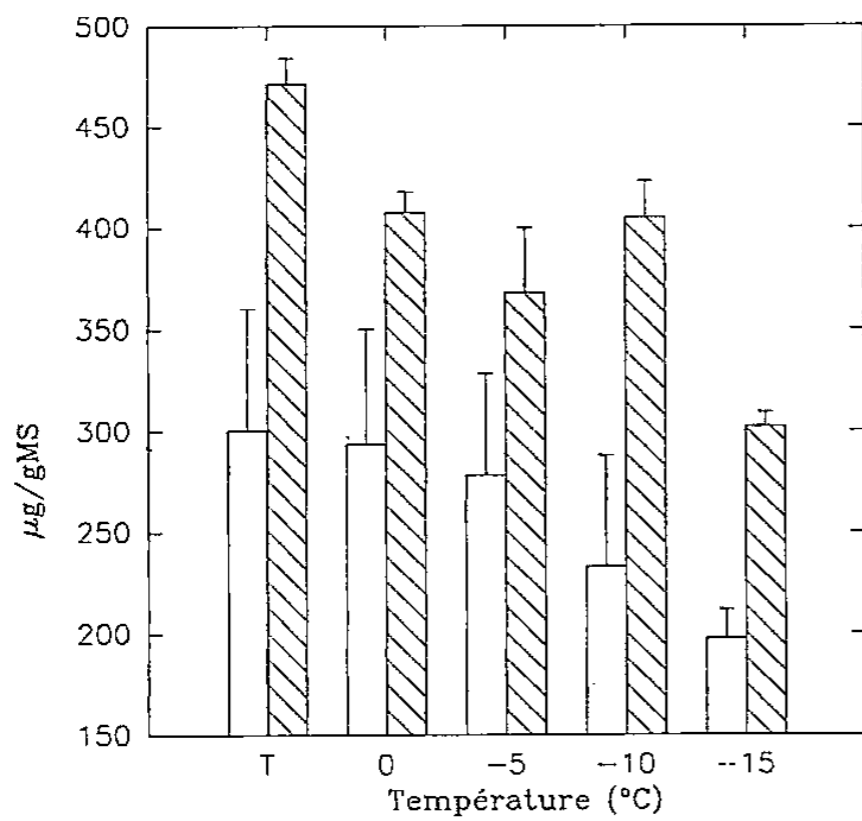
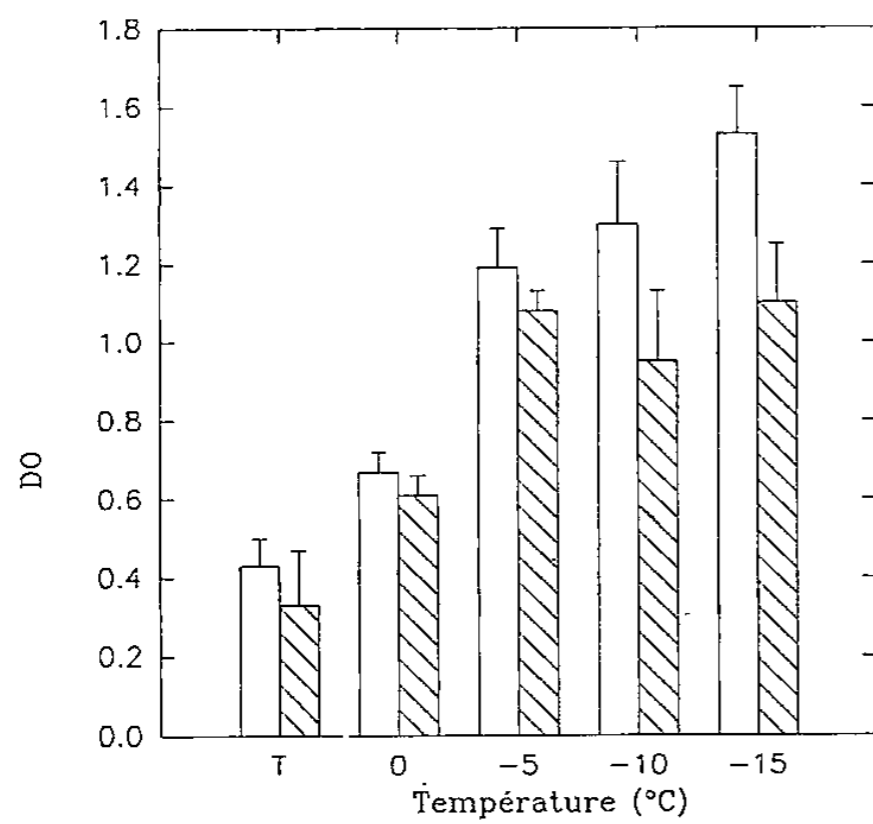
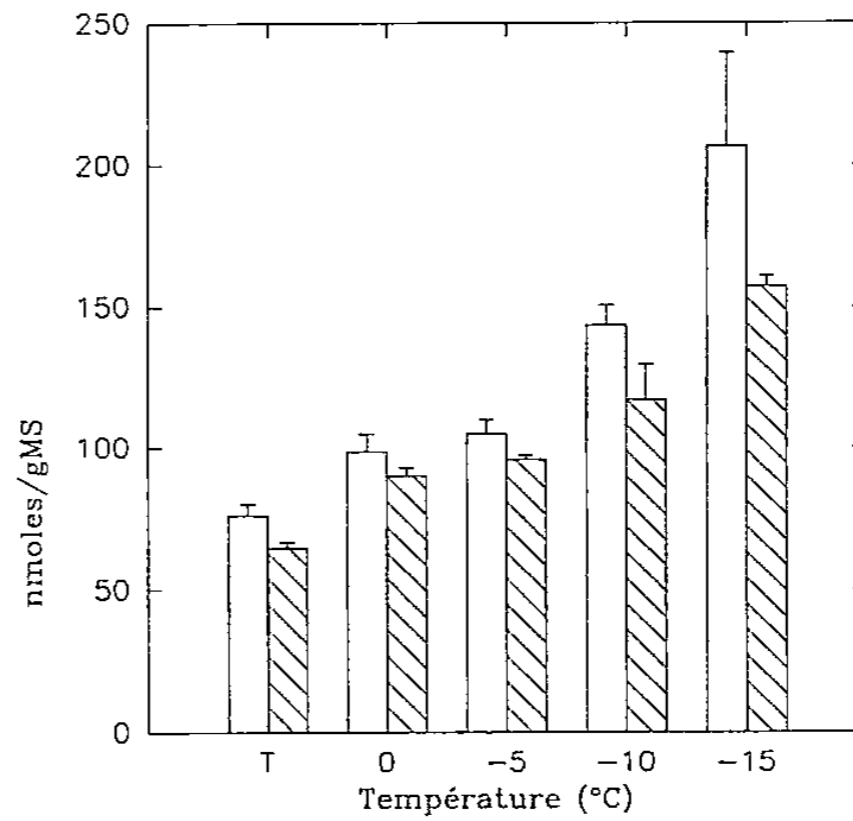


Fig. 3. — Évolution en fonction de la température, des teneurs pondérales en digalactosyldiacylglycerol des racines endurcies (▨) et non endurcies (□). T : température de référence avant le gel. Les barres verticales représentent l'écart type.

Fig. 3. — Change in digalactosyldiacylglycerol with temperature in cold-acclimated roots (▨) and non-acclimated roots (□). T: reference temperature before freezing. Vertical bars represent standard deviation.



A



B

Fig. 4. — Évolution des taux de peroxydes (fig. 4A) et de MDA (fig. 4B) des racines endurcies (▨) et non endurcies (□) en fonction des basses températures. T : température de référence avant le gel. Les barres verticales représentent l'écart type.

Fig. 4. — Changes in peroxide (Fig. 4A) and malondialdehyde levels (Fig. 4B) with the temperature in acclimated-roots (▨) and non-acclimated roots (□). T: reference temperature before freezing. Vertical bars represent standard deviation.





## Facteurs enzymatiques du brunissement *in vitro* et capacité embryogène des cals d'*Hevea brasiliensis*

Fatima HOUSTI, Michel COUPÉ et Jean D'AUZAC

**Résumé** — Les cals tissulaires d'*Hevea* montrent souvent, dès 40 jours de culture, un brunissement (nécrose) entravant leur développement embryogène. Le brunissement apparaît en même temps que de fortes activités peroxydases (PO), polyphénoloxydases (PPO) soluble et liée, alors qu'augmente la superoxyde dismutase (SOD) et que la catalase (CAT), importante au départ, tend vers zéro. L'analyse séparée de cals clairs ou nécrosés montre chez ces derniers des activités PO, PPO liée, NADH-quinone réductase (NQR) plus importantes alors que PPO soluble et SOD sont sensiblement plus faibles. Ceci peut traduire une opposition entre les enzymes produisant ou utilisant des formes toxiques d'oxygène (PO, PPO, NQR) et celles qui les neutralisent (SOD, CAT). De faibles teneurs en hormones en première subculture favorisent le développement du potentiel embryogène mais aussi le brunissement lequel s'oppose finalement au développement des embryons.

### Enzymatic factors in browning *in vitro* and the embryogenic capacity of *Hevea brasiliensis* callus

**Abstract** — Rubber tree tissue callus frequently displays browning (necrosis) after 40 days of culture which impedes embryogenic development. The browning appears at the same time as strong peroxidase (PO) and soluble and bound polyphenoloxidase (PPO) activities, whereas there is an increase in superoxide dismutase (SOD) and the initially considerable catalase (CAT) decreases towards zero. Separate analysis of pale and necrotic callus revealed greater PO, bound PPO and NADH-quinone reductase (NQR) activities, whereas soluble PPO and SOD were distinctly weaker. This may indicate opposition between the enzymes producing or taking up toxic forms of oxygen (PO, PPO, NQR) and those which neutralize them (SOD, CAT). Low hormone contents in the first subculture enhanced the development of embryogenic potential and also the browning which finally prevented the development of embryos.

**Abridged English Version** — Somatic embryogenesis is one of the methods of approaching *in vitro* multiplication of *Hevea brasiliensis* [1]. However, callus from the inner integument of immature fruits frequently displays browning (necrosis) *in vitro* which leads to tissue degeneration and the stopping of embryogenic development. The work in the literature on browning *in vitro* is more concerned with control methods ([2]-[7]) than with the biochemistry of the phenomenon.

The browning classically results from a cellular decompartmentation involving vacuolar phenols and mainly cytoplasmic enzymes [8]. This decompartmentation is often due to a membranal degradation by toxic forms of oxygen [9].

Explants from integuments of immature *Hevea* seeds were cultured on MH1 callogenesis medium [10] containing 4.5  $\mu\text{M}$  of 3.4-D and BAP and 30  $\mu\text{M}$  of  $\text{AgNO}_3$  [11]. After 25 days the callus was subcultured on a medium with a low hormone content (0.45  $\mu\text{M}$  of 3.4-D and BAP) and enriched with spermidine 50  $\mu\text{M}$  (12). Analytical methods have been described previously ([13]-[16]).

Progressive browning of callus was observed in the first subculture in *in vitro* development of the explants. This was related to a considerable increase in peroxidase (PO) and free and bound polyphenoloxidase (PPO) activities, and, to a lesser extent, in superoxide dismutase (SOD) activity. In contrast, there was a spectacular decrease and disappearance of catalase (CAT) activity in the callus. NADH-quinone reductase (NQR) activity, producing toxic oxygen ( $\text{O}_2^-$ ), remained practically stable (Fig. 1). In experiments carried out for a longer

Note présentée par Alexis MOYSE.

time SOD and PPO activities decrease at varying rates on day 40. A breakdown of PO activities at day 60 goes with a more or less complete degeneration of the tissues.

Separate analysis of pale and necrotic callus after 46 days of culture showed that PO, bound PPO and NQR activities were greater in necrotic callus whereas soluble PPO and SOD were distinctly lower (Fig. 1).

Observation on day 55 of the different calli classified according to the percentage of browning showed that only 3% were not or only slightly necrotic and were then 100% embryogenic. 60% of the 50-75% necrotic calli were embryogenic. Only 11% of the totally necrotic calli bore embryos; these formed before total necrosis (Fig. 2). The culture conditions used enhanced tissue browning although they did enable the appearance of embryos which degenerated fairly rapidly.

Consideration of the biochemical browning mechanism leads to the conclusion that the increase in PO activity and the disappearance of CAT are sufficient to cause browning; the increase in bound PPO activity has a similar effect.

The toxic forms of oxygen ( $O_2^-$ ) produced almost continuously by NQR may be neutralised by SOD (with production of  $H_2O_2$ ) if CAT activity did not dwindle progressively. In this case, the Haber-Weiss reaction [17] produces even more toxic forms of oxygen, such as  $OH^\cdot$  which is particularly aggressive towards the unsaturated fatty acids of membrane phospholipids and hence causes cell decompartmentation [18]. While a correlation is classically found between browning and PPO activity ([19], [20]) the originality of this work is the disappearance of catalase activity. Under the conditions used, an imbalance thus occurred between the enzymes which enhance browning (PO, PPO, NQR) and protective enzymes (SOD, CAT).

A hormone shock is classically used to switch from callogenesis to embryogenesis ([21]-[23]); however, it would seem that too sharp a reduction in hormones may harm embryogenesis by enhancing browning [24]. This fact does not exclude that in other conditions perfectly clear calli are totally devoid of embryogenic potentialities.

---

INTRODUCTION. — Étant donnée l'importance économique de l'*Hevea* et son mode de propagation par greffage, sa multiplication *in vitro* a fait l'objet de nombreux travaux [1]. Plusieurs voies d'approche sont abordées, notamment l'embryogenèse somatique.

Les cals issus du tégument interne de fruits immatures sont les plus prometteurs bien qu'ils présentent souvent un phénomène de brunissement qui conduit rapidement à la nécrose des tissus sans que la biochimie du phénomène soit connue.

Alors que le phénomène de brunissement a été largement étudié chez les fruits, il n'est que rarement considéré en culture *in vitro*. Les travaux dans ce domaine concernent plus les moyens de lutte que les mécanismes du phénomène. Ainsi, le polyvinylpyrrolidone (PVP) donné comme piège à phénols réduit considérablement le brunissement chez *Hamamelis* [2] alors qu'il n'a qu'un faible effet sur des cals de *Pinus sylvestris* [3]. Chez les cals de *Parthenium argentatum* le remplacement du milieu solide par un milieu liquide se révèle aussi très bénéfique [4] sans que l'on puisse l'expliquer. L'acide ascorbique et la cystéine réduisent l'oxydation des phénols chez le café [5]. L'obscurité et le charbon actif évitent également le brunissement de ce matériel [6]. Le charbon actif qui est un absorbant des composés phénoliques restaure le potentiel embryogène des cals de *Quercus petraea* et de *Fagus sylvatica* [7].

Le brunissement résulte classiquement d'une mise en contact des systèmes oxydatifs (essentiellement cytoplasmiques) et de leurs substrats (plutôt vacuolaires) [8]. Ce phénomène implique une décompartmentation cellulaire consécutive à des traumatismes mécaniques (coupe, blessure, attaque de pathogènes), à la sénescence des tissus ou à une dégradation accidentelle des membranes, par des formes toxiques d'oxygène lesquelles sont impliquées dans la sénescence foliaire [9].

Le but essentiel de ce travail est d'aider à la compréhension des mécanismes du brunissement, en culture *in vitro*. Pour ce faire, on a pris en compte des systèmes enzymatiques classiquement impliqués dans l'oxydation des composés phénoliques, la production et la neutralisation des formes toxiques d'oxygène et on a cherché à relier leur activité à l'intensité du brunissement mais aussi à la conservation du potentiel embryogène des cals obtenus.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — Les explants sont issus des téguments internes des graines prélevées aseptiquement sur des fruits immatures [10]. Ils sont mis en culture sur un milieu MH1 [10] supplémenté en acide 3,4-dichlorophénoxyacétique (3,4-D), 4,5  $\mu\text{M}$ ; benzylaminopurine (BAP), 4,5  $\mu\text{M}$  et  $\text{AgNO}_3$ , 30  $\mu\text{M}$  [11]. Après 20-25 jours, les cals sont repiqués sur le même milieu de base dont la teneur en hormone est réduite (3,4-D et BAP : 0,45  $\mu\text{M}$ ) et qui est complémenté en spermidine, 50  $\mu\text{M}$  [12].

L'effectif des explants mis en culture pour un traitement donné d'une expérience est de 200 minimum. Ainsi, pour chaque stade étudié, un échantillon de 30 à 40 cals, représentatif de l'ensemble, est prélevé, lyophilisé et conservé sous vide à  $-18^\circ\text{C}$ .

Au moment de l'extraction, les cals sont broyés et homogénéisés sous azote liquide. Par la suite 200 mg de cette poudre sont homogénéisés au froid dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,3) contenant 5% de polyclar AT. L'extrait est centrifugé (40 000  $\text{g} \times 20$  mn) puis le culot après agitation est remis en suspension, agité 20 mn et extrait une 2<sup>e</sup> fois dans le même tampon. Les 2 surnageants réunis constituent l'extrait brut sur lequel sont effectués les dosages des activités enzymatiques solubles. Le culot est repris une troisième fois par le même tampon en présence de 1% de triton X 100 afin d'extraire les polyphénoloxydases (PPO) liées.

La peroxydase (PO) est déterminée par spectrophotométrie à 470 nm en présence de gaïacol et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [13]. L'activité catalase (CAT) est mesurée à 240 nm en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [13]. La superoxyde dismutase est évaluée par la formation de formazan à 560 nm selon la méthode de Beauchamp et Fridovich [14]. La NADH-quinone réductase (NQR) est déterminée par la méthode de Hoffman [15] qui utilise également le formazan. La PPO est mesurée à l'oxygraphe par la consommation d'oxygène en présence de 4-méthycatéchol. Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford [16].

Le dosage des activités enzymatiques sur 3 extraits différents d'une même poudre donne un coefficient de variation de 2 à 6%.

En fin de culture un examen attentif permet de distinguer les cals dit embryogènes portant des embryons ou proembryons visibles à l'œil nu.

**RÉSULTATS.** — L'analyse des activités enzymatiques en fonction du développement des cals montre des évolutions différentes selon l'enzyme considérée. Ainsi la PO, les PPO soluble et liée et la SOD augmentent au cours du temps de culture d'une façon assez semblable (*fig. 1*). Dans des expériences menées à plus long terme les activités SOD et PPO chutent vers 40 jours; un effondrement de l'activité PO vers 60 jours accompagne la dégénérescence quasi totale des cultures.

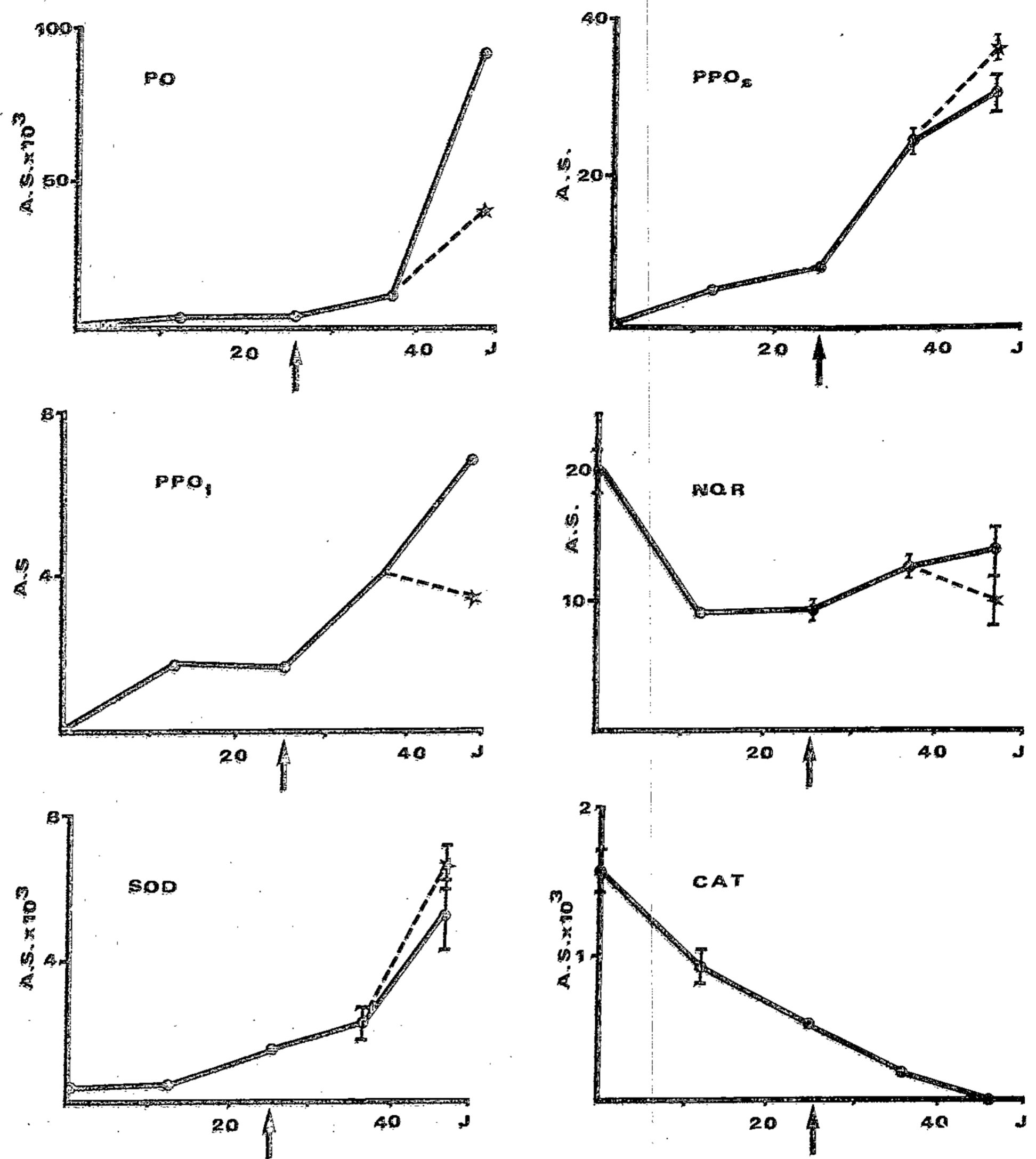


Fig. 1. — Évolution des activités spécifiques (n kat mg prot.) des peroxydases (PO), polyphénoloxydases solubles et liées (PPO<sub>s</sub>, PPO<sub>1</sub>), NADH-quinone-réductase (NQR), superoxyde-dismutase (SOD) et catalase (CAT) en fonction de l'âge de la culture. La barre représente l'intervalle de confiance pour  $p=0,05$ . -----, cals clairs. ———, cals nécrosés.

Fig. 1. — Evolution of specific activities (n kat/mg prot.) of peroxidases (PO), soluble and bound polyphenoloxidas (PPO<sub>s</sub>, PPO<sub>1</sub>), NADH-quinone-reductase (NQR), superoxide-dismutase (SOD) and catalase (CAT) according to the age of the culture. The bars represent the confidence interval for  $p=0,05$ . -----, pale callus. ———, necrotic callus.

La CAT, par contre, présente une activité très importante dans les explants; elle décroît régulièrement au cours de la culture et n'est plus dosable entre 40 et 50 jours selon les expériences (fig. 1).

L'activité NQR (fig. 1) génératrice d'ions  $O_2^-$  est maximale chez les explants initiaux (JO); elle diminue puis se stabilise par la suite.

Il est extrêmement fréquent de constater dans un récipient de culture une hétérogénéité dans le brunissement des différents explants introduits. On a pu ainsi séparer à 46 jours

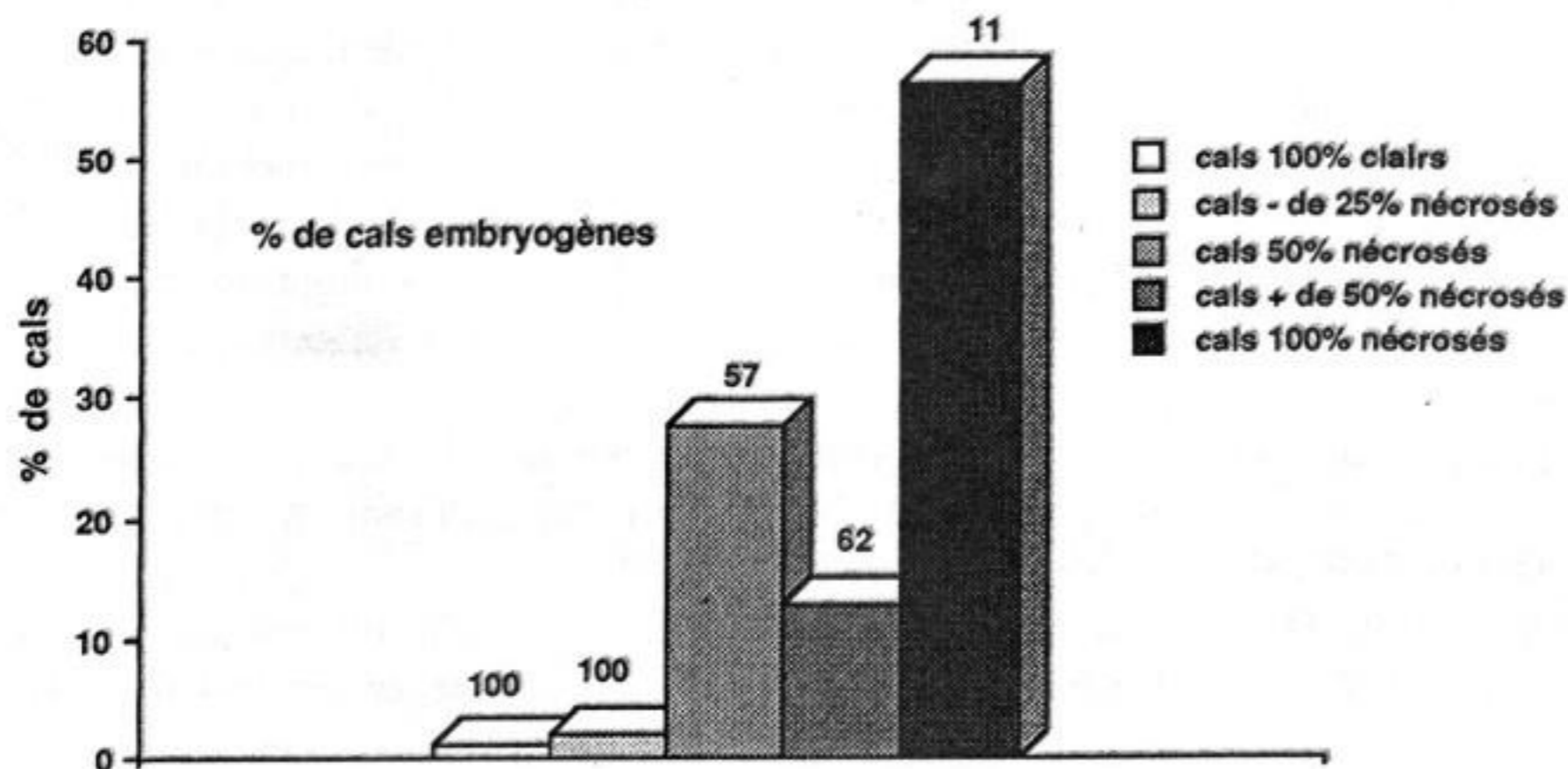


Fig. 2. — Pourcentage des cals clairs et nécrosés après 55 jours de culture et pourcentage de cals embryogènes dans chaque groupe.

Fig. 2. — The percentages of pale and necrotic calli after 55 days of culture and the percentage of embryogenic calli in each group.

les cals totalement clairs de ceux qui sont partiellement ou totalement nécrosés. L'analyse séparée de ces cals montre alors que la nécrose est concomitante d'activités PO, PPO liée et NQR significativement supérieures. Les activités PPO solubles sont significativement inférieures chez ces mêmes cals nécrosés tandis que l'activité SOD serait inférieure à la limite de la signification (*fig. 1*).

Si l'on considère à J 55 le potentiel embryogène estimé sur 101 cals dans nos conditions de culture (*fig. 2*), les cals totalement clairs ou faiblement nécrosés ne représentent que 3 % de l'ensemble des cals mais ils sont tous embryogènes. Les cals portant 50 à 75 % de nécrose sont encore embryogènes à 60 % tandis que la capacité embryogène des cals totalement nécrosés n'est que de 10 % et d'ailleurs elle s'était exprimée avant la nécrose totale.

**DISCUSSION.** — Ces résultats montrent que les conditions de culture adoptées ici induisent le brunissement puis la nécrose des cals. Elles permettent toutefois l'apparition d'un certain potentiel embryogène lequel ne peut d'ailleurs pas s'exprimer par la suite de la dégénérescence des tissus.

Les téguments internes lors de leur introduction *in vitro* se caractérisent globalement par l'absence quasi absolue d'activités PO, PPO soluble et liée et une très faible activité SOD. A l'opposé on mesure des activités CAT et NQR importantes.

L'examen de l'évolution de ces activités enzymatiques lors de la culture montre clairement des variations opposées, l'augmentation des activités peroxydase (néfaste), la diminution de l'activité catalase (protectrice) contribuent logiquement au brunissement des tissus et pourraient à elles seules expliquer globalement ce phénomène. L'apparition des activités PPO liée contribue au brunissement. Les activités NQR, productrice d'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et SOD, détoxifiante de cet  $O_2^{\cdot-}$ , s'opposent globalement au long de la culture bien qu'à des niveaux différents. La comparaison des cals clairs et nécrosés à J 46 conforte cette interprétation en montrant le caractère néfaste de la NQR et protecteur de la CAT.

La présence constante dans le tissu d'une activité NQR génératrice d' $O_2^{\cdot-}$  peut être compensée par une activité SOD suffisante pour transformer  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ . Cependant, dès lors que la catalase sera insuffisante pour détoxifier  $H_2O_2$ , cette molécule pourra

réagir avec  $O_2^-$  par la réaction d'Haber-Weiss [17] pour produire le radical  $OH^\bullet$  particulièrement agressif vis-à-vis des acides gras insaturés constituant des phospholipides membranaires [18] et contribuer ainsi à leur dégradation puis à la décompartmentation cellulaire.

Alors que la liaison entre activité PPO et brunissement a été maintes fois établies chez les fruits, tels par exemple l'olive [19] et la pomme [20] une originalité du présent travail est la mise en évidence de la disparition progressive d'une activité catalase éminemment protectrice.

Il apparaît clairement que la mise en culture entraîne un déséquilibre entre les enzymes favorisant le brunissement (PPO, PO, NQR) et celles assurant la détoxification de l'oxygène toxique (SOD et CAT).

On sait aujourd'hui qu'une réduction importante du taux d'hormones après l'initiation de la callogenèse est nécessaire pour l'induction embryogène en général ([21], [22]) et aussi chez l'*Hevea* [23]. Les résultats présentés ici confirment ces observations mais l'on peut penser que le choc induit à J 20-J 25 par la chute considérable du taux d'hormones introduites dans le milieu n'est pas sans conséquence sur le brunissement des tissus [24] alors que dans d'autres conditions, des cals parfaitement clairs peuvent être totalement dépourvus d'une potentialité embryogène. C'est ainsi qu'on peut observer chez *Quercus petrae* et *Fagus sylvatica* que la diminution du brunissement des cultures d'anthers provoquée par le PVP ne permet pas la formation des embryons [6].

Nous remercions la station de Bimbresso de l'I.R.C.A. en Côte d'Ivoire pour l'aimable fourniture de fruits immatures.

Note remise le 6 mai 1991, acceptée après révision le 16 septembre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. P. CARRON, F. ENJALRIC, L. LARDET et A. DESCHAMPS in *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, éd. YPS BAJAJ, 5, (III), 1989, p. 221-245.
- [2] J. CHRISTIANSEN et M. FONNESBECH, *Acta Horticulturae*, 54, 1975, p. 101-104.
- [3] A. HOHTOLA, *5th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology (FESPP)*, 1986, p. 1316.
- [4] A. ILSE TRAUTMANN et J. O. H. VISSER, *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 16, 1989, p. 39-46.
- [5]-[6] J. M. BONGA et D. J. DURZAN, *Cell and Tissue Culture in Forestry*, 2, Martinus Nijhoff Publishers, 1987, 447 p.
- [7] J. JORGENSEN, *J. Plant Physiol.*, 132, 1988, p. 638-640.
- [8] A. MAYER et E. HAREL, in *Recent advances of the biochemistry of fruits and vegetables*, J. FRIEND et M. J. C. RHODES, Academic Press, 1981, p. 171-180.
- [9] J. E. THOMPSON, R. L. LEGGE et R. F. BARBER, *New Phytol.*, 105, 1987, p. 317-344.
- [10] M. P. CARRON et F. ENJALRIC, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 300, série III, 1985, p. 653-658.
- [11] E. AUBOIRON, M. P. CARRON et N. MICHAUX-FERRIERE, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21, 1990, p. 31-37.
- [12] I. EL. HADRAMI, N. MICHAUX-FERRIERE, M. P. CARRON et J. D'AUZAC, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 308, série III, 1989, p. 205-211.
- [13] B. CHANCE et A. C. MAEHLY, *Methods in Enzymology*, 11, S. P. COLLOWICK et N. O. KAPLAN éd., Academic Press, New York, 1955, p. 764-775.
- [14] C. BEAUCHAMP C. et I. FRIDOVICH, *Anal. Biochem.*, 44, 1971, p. 276-287.
- [15] P. S. HOFFMAN, L. PINE et S. BELL, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1983, p. 784-791.
- [16] M. BRADFORD, *Anal. Biochem.*, 72, 1976, p. 248-254.
- [17] B. HALLIWEL, *F.E.B.S. Letters*, 92, 1978, p. 321-326.
- [18] J. D'AUZAC, C. SANIER et H. CHRESTIN in *Proc. Int. Rubber Conf.*, Kuala-Lumpur, 3, 1985, p. 102-112.
- [19] V. SCIANCALEPORE, *Food Science*, 50, 1985, p. 1194-1195.
- [20] M. Y. COSETING et C. Y. LEE, *J. Food Sci.*, 52, 1987, p. 985-989.
- [21] R. LINACERO et A. M. VAZQUEZ, *Plant Science*, 44, 1986, p. 219-222.
- [22] E. G. M. MEIJER et D. C. W. BROWN, *Physiologia Plantarum*, 69, 1987, p. 591-596.
- [23] I. EL HADRAMI, M. P. CARRON et J. D'AUZAC, *Annals of Botany*, 67, 1991, p. 511-515.
- [24] A. J. SCHMIDT, J. M. LEE et G. AN, *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 1988, p. 1437-1444.

## Régénération de plantes à partir de protoplastes foliaires d'un clone d'orme champêtre (*Ulmus campestris* Mill.)

Noëlle DORION, Pascal DANTHU, Shizuka OHKI, Christiane PRENEUX, Béatrice GODIN et Claude BIGOT

**Résumé** — Des protoplastes foliaires d'orme champêtre ont été obtenus ( $5,5 \cdot 10^7$ /g de m.f.) à partir de feuilles jeunes prélevées sur des plantes microbouturées *in vitro* depuis 55 jours. A l'obscurité, les divisions sont apparues après 4 à 10 jours de culture ( $3 \cdot 10^5$  protoplastes/ml). Le processus a été entretenu par le renouvellement partiel du milieu tous les 7 à 10 jours, et l'addition de lait de coco (2 %) à 21°C. Le pourcentage de colonies obtenues a varié entre 0,4 et 5 %. Des bourgeons ont été initiés dans des cals de 2 à 3 mm de diamètre. Les plantes enracinées, acclimatées en serre se sont développées normalement.

### Plant regeneration from leaf protoplasts of common elm (*Ulmus campestris* Mill.)

**Abstract** — Leaf protoplasts of common elm were obtained ( $5.5 \times 10^7$ /g.f.w.) from young unfolded leaves of 55-day-old micropropagated plants. In the dark, mitosis was observed after 4-10 days after plating ( $3 \times 10^5$  p/ml). Partial renewal of the medium (7-10 days) and addition of coconut water (2%) at 21°C sustained the division process. Plating efficiency was 0.4-5%. Shoot organogenesis was obtained in small calli (2-3 mm). Rooted plants were acclimatized in the greenhouse where they grew normally.

**Abridged English Version** — I. INTRODUCTION. — Because of their susceptibility to Dutch Elm Disease, European and American elms are disappearing. Several drawbacks such as length of the juvenile period, incompatibility phenomena and scarcity of resistant genotypes, complicate improvement of tolerance by hybridization. Use of protoplasts could provide an alternative to conventional hybridization ([2], [3]), if plant regeneration could be achieved. Shoot neof ormation, in elm tissue culture, has been known for a long time ([4], [5]), but only one report has noted plant regeneration from callus protoplasts [6]. In this paper, for the first time, a procedure for leaf protoplast isolation and culture leading to rooted common elm plants is described.

II. MATERIAL AND METHODS. — One clone of common elm (OcBa) was used. Leaves were excised from plants micropropagated [7] and subcultured from 25-85 days.

Leaves were floated for 1 hr. on a preplasmolysis medium, containing MS macro-nutrients [8] at half strength, Heller's micronutrients [9], vitamins [11], mannitol (0.55 M), Fe as Fe-citrate-ammonium complex (Fe 160  $\mu$ M) [10] and MES (3.5  $\mu$ M) as pH buffer (5.5). Cut leaves (1 mm strips) were incubated for 17 hrs. (8 hrs. dark/9 hrs. light) in the growth chamber (21/26°C) in a filter-sterilized enzyme solution. Enzymes were added to the previous medium with sucrose (0.03 M) and mannitol (0.6 M). Protoplasts were released by a 10 min. alternative shaking, filtered through 2 sieves (150, 36  $\mu$ m), and collected after 3 centrifugations (55 g, 5 min.), first on an isotonic solution of KCl (3.8%), then in a mixture of culture medium and KCl solution (in succession, 1/1 and 2/1).

Protoplasts ( $1.5-6 \times 10^5$  p./ml) were plated in liquid basal medium, complemented by calcium chloride (0.2%) [12], NAA (16.5  $\mu$ M), BAP (4.5  $\mu$ M) and coconut water (2%). Mannitol was set up to 0.65 M. The medium was partially renewed (1/3) each 7-10 days and NAA concentration lowered (0.55  $\mu$ M). After 3 weeks clusters were diluted; between the 4th and 8th weeks, mannitol concentration was lowered to 0.4 M and then to 0.2 M

Note présentée par Roger GAUTHERET.



during the next month. Colonies (0.5-1 mm) were plated on agar medium without mannitol. For shoot regeneration and/or elongation, colonies (2-3 mm) were subcultured on basal medium containing IBA (0.05  $\mu\text{M}$ ), BAP (2.3  $\mu\text{M}$ ), GA<sub>3</sub> (1.4  $\mu\text{M}$ ) and glucose (110 mM), then on rooting medium [7]. Acclimatization of rooted plantlets was carried out in mini-glasshouses at 18-20°C for 3 weeks.

III. RESULTS. — As for other elm species [12], 3 enzymes were needed for protoplast isolation: Onozuka RS (0.2%), Driselase (0.1%), Pectolyase Y 23 (0.03%). Released protoplasts had a diameter ranging from 15-25  $\mu\text{m}$  (Fig. 1). Yield and initial survival was improved when mannitol was used instead of sucrose or KCl for the same osmotic pressures (1.34-1.63 MPa), and when the youngest expanded leaves were taken from 55-day-old plants (Table I). Yield of protoplasts reached  $5.5 \times 10^7$  p./g. f.w. During rinsing procedure, the use of a discontinuous gradient with KCl at the bottom allowed the separation of protoplasts from enzyme mixture; then the lowering of medium density by addition of KCl solution enhanced the final recovery of viable protoplasts: 86% instead of 40% when centrifugations were performed in the culture medium alone.

Divisions were noticed after 4-10 days (Fig. 2), when protoplasts (survival >85%) were plated in the dark at  $3 \times 10^5$  p./ml. Plating efficiency after 5-8 weeks was 0.4-5% according to the experiments. The highest number of colonies (Fig. 3) was obtained when coconut water was added to the medium at 21°C (Table II). Shoots were observed after 4-12 months (Fig. 4) on calli transferred under light (16 hrs., 21 W.m<sup>-2</sup>). Regeneration frequency was low ( $2.4 \times 10^{-7}$ ), nevertheless 9 rooted plantlets (Fig. 5) were acclimatized and grown in the greenhouse (Fig. 6) where they developed normally.

CONCLUSIONS. — For the first time, common elm was regenerated from leaf protoplasts. According to earlier results, our observations pointed out the usefulness of leaves from *in vitro* mother-plants as protoplast source ([13] to [16]), the importance of a competence state ([16], [6]) noted here by leaf rank and date of the last subculture, the significance of darkness in the first stages of protoplast development ([14], [16]), the beneficial effect of coconut water [18] and efficiency of partial medium renewal [2]. In contrast, it was observed that mild temperature has a better influence on elm protoplast divisions than high temperatures generally used (25-28°C) [19]. The results reported here should be easily adapted to other elm clones, since 8 plants were recently regenerated from one experiment done with the Dutch hybrid "Dodoens". Nevertheless, the process of protoplast culture and plant regeneration still have to be improved.

---

INTRODUCTION. — Les espèces européennes et américaines du genre *Ulmus* sont presque totalement décimées par la Graphiose. La longueur de la période juvénile (environ 10 ans), la rareté de sources de résistance (*U. pumila* L., *U. parvifolia* Jacq.) et l'existence de phénomènes d'incompatibilité compliquent l'obtention d'ormes résistants par croisements. Actuellement, seul « Sapporo Gold 2 », hybride sélectionné aux États-Unis [1] présente une tolérance satisfaisante.

A condition de maîtriser la régénération de plantes, l'utilisation des protoplastes peut fournir une alternative aux méthodes d'hybridation conventionnelles ([2], [3]). Pour le genre *Ulmus*, les capacités de régénération *in vitro* sont connues depuis longtemps ([4], [5]), pourtant l'obtention de plantes n'a été mentionnée qu'une seule fois à partir de protoplastes de cals [6].

La présente Note décrit, pour la première fois, les conditions d'obtention et de culture de protoplastes foliaires d'orme champêtre conduisant à la néoformation de plantes.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — *Matériel végétal.* — L'expérimentation a été réalisée sur un clone d'orme champêtre (OcBa) récolté à l'Arboretum des Barres, et multiplié *in vitro* par microbouturage de nœuds et d'apex selon la méthode mise au point au laboratoire [7]. Pour la préparation des protoplastes, les feuilles ont été prélevées sur ces plantes, 25 à 85 jours après le repiquage.

*Isolement des protoplastes.* — Pendant la durée du prélèvement (1 h) les feuilles sont placées à 25°C dans un milieu de préplasmolyse composé des macroéléments de Murashige et Skoog [8] dilués au demi, des microéléments de Heller [9], de fer ajouté après autoclavage (112°C, 20 mn) sous forme d'un complexe Fe-citrate d'ammonium [10] (Fe 160 µM), et de vitamines [11]. La plasmolyse est réalisée par le mannitol (0,55 M), le pH est ajusté à 5,5 et stabilisé par 3,5 mM de MES (acide N-morpholino éthane sulfonique). Les feuilles sont ensuite lacérées (bandes de 1 mm) et transférées dans une solution d'enzymes stérilisée par filtration (0,45 µm). Les enzymes sont introduits dans le milieu précédent complété en saccharose (0,03 M) et en mannitol (0,6 M). Les feuilles sont incubées 17 h (dont 8 h à l'obscurité) dans la chambre de culture (26/22°C). A la fin, une agitation alternative de 10 mn, libère les protoplastes. La suspension diluée (1/3) avec une solution isotonique de KCl (3,8 %) est passée sur 2 tamis de mailles 150 puis 36 µm. Le filtrat est alors déposé sur la solution de KCl dans laquelle les protoplastes, séparés des enzymes, migrent pendant la centrifugation (55 g, 5 mn). Deux centrifugations complémentaires sont réalisées dans les milieux contenant en mélange, la solution saline et le milieu de culture (proportions 1/1 puis 1/2).

*Culture des protoplastes.* — Les protoplastes ont été mis en culture, en milieu liquide, à raison de 1,5 à 6.10<sup>5</sup> protoplastes vivants/ml. Outre les éléments de base déjà décrits, ce milieu comprend, du chlorure de calcium (0,2%) [12], l'acide naphthalène acétique (ANA, 16,5 µM), la benzylaminopurine (BAP, 45 µM) et du lait de coco (2 % coconut water, Difco). Le mannitol a été porté à 0,65 M. Le milieu a été renouvelé par 1/3 tous les 7 à 10 jours. Dès ce moment la quantité d'ANA a été diminuée (5,5 µM). A partir de la 3<sup>e</sup> semaine, selon leur développement, les colonies ont été diluées au demi; la concentration de mannitol a été abaissée entre 4 et 8 semaines (0,4 M), puis 1 mois plus tard (0,2 M). Les colonies de 0,5 à 1 mm de diamètre ont été étalées sur le même milieu gélosé (Difco, 8 g.l<sup>-1</sup>) sans mannitol.

*Régénération de plantes.* — Des cals (2 à 4 mm) ont été disposés sur un milieu favorisant la régénération de l'hybride hollandais Dodoens (résultats non publiés) caractérisé par la présence de glucose (110 mM), d'acide indole butyrique (AIB, 0,05 µM), de BAP (2,3 µM) et d'acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>, 14 µM). Les tigelles (5 mm) ont été isolées sur le milieu de microbouturage [7] pour allongement et enracinement. Les plantes ont été acclimatées à 18/20°C en miniserre pendant 3 semaines, dans un mélange (1/1) de tourbe fertilisée et de vermiculite, puis élevées dans une serre non climatisée.

*Méthodes de comptage.* — Le nombre de protoplastes sphériques, considérés comme vivants, a été évalué par comptages à l'hématimètre de Malassez (1 mm<sup>3</sup>); cette méthode est aussi sûre qu'une coloration au bleu d'Evan [13]. L'efficacité des traitements a été déterminée, soit par le pourcentage de protoplastes divisés (comptages dans une cellule de 10 mm<sup>3</sup>), soit par le nombre de colonies supérieures à 5 cellules, présentes dans

TABLEAU I

Effet de l'état physiologique des pieds-mères cultivés *in vitro* sur la survie initiale (%) et le rendement en protoplastes vivants (pour 1 g de matière fraîche). Les chiffres suivis de la même lettre ne diffèrent pas à P 0,05

*Effect of physiological state of micropropagated mother plants on initial survival (%) and yield of viable protoplasts (per gramme of fresh weight). Number followed by the same letter are not different at P 0.05*

Niveau d'insertion des feuilles déployées à partir de l'apex	Nombre de jours depuis le repiquage					
	25		55		85	
	Survie (%)	Rendement (10 <sup>7</sup> )	Survie	Rendement	Survie	Rendement
1. ....	30	0,2 a	85	5,8 c	4	0,1 a
2. ....	37	0,5 a	85	5,1 c	5	0,1 a
3. ....	18	0,3 a	70	1,5 b	17	0,2 a
4. ....	8	0,1 a	37	0,4 a	27	0,3 a

0,058 ml. Le logiciel STAT-ITCF, a été utilisé pour les calculs statistiques, ainsi que le test de Newman-Keuls pour la comparaison des moyennes.

RÉSULTATS. — *Isolement des protoplastes.* — Comme pour d'autres ormes [12], 3 types d'enzymes sont indispensables, aux concentrations suivantes : 0,2% d'Onozuka RS, 0,1% de Driselase et 0,03 % de Pectolyase Y 23. L'efficacité de ce mélange dépend de la présence de mannitol (de 1,34 à 1,63 MPa), plutôt que de saccharose ou de KCl. Les feuilles jeunes prélevées sur des plantes repiquées depuis 55 jours (tableau I) sont les plus aptes et libèrent environ  $5,5 \cdot 10^7$  protoplastes/g de m.f. dont le diamètre varie entre 15 et 25  $\mu\text{m}$  (fig. 1). Le rinçage des protoplastes ne peut s'effectuer directement dans le milieu de culture. En effet, pour une accélération de 55 g, 60 % des protoplastes sont perdus au cours des centrifugations, et pour une accélération supérieure la nécrose est totale. Par contre lorsque la densité du milieu est diminuée par l'utilisation du KCl, il est possible de récupérer 86 % des protoplastes.

*Culture des protoplastes.* — Dans cette phase, l'obscurité favorise la survie après 1 semaine (56 % contre 47 % à la lumière; 16 h, 21 W. m<sup>-2</sup>) et l'apparition des divisions. Il en est de même pour une densité initiale de  $3 \cdot 10^5$  protoplastes/ml (68 % contre 30 % environ pour des inoculum inférieurs ou supérieurs). Dans ces conditions les divisions ont été observées après 4 à 10 jours de culture (fig. 2). Leur pourcentage, après 5 à 8 semaines, a varié entre 0,4 et 5 %. Les valeurs les plus élevées ont été trouvées dans les milieux contenant du lait de coco (1,5 % contre 0,8 % pour le témoin). Une température de culture de 21°C (tableau II) facilite la croissance des colonies.

*Régénération de plantes.* — Des bourgeons (fig. 4) sont apparus après 4 à 12 mois, soit sur le milieu initial, soit sur le milieu de régénération, après transfert des cultures à la lumière. Dans un premier essai, 11 calcs seulement ont présenté des bourgeons, soit une fréquence de régénération faible de  $2,4 \cdot 10^{-7}$ . L'allongement et l'enracinement ont été obtenus sur un milieu sans régulateur de croissance ni charbon actif (fig. 5); un passage sur le milieu de microbouturage complet [7] a cependant été nécessaire avant l'acclimatation. Actuellement, 9 plantes ont été transférées en serre (fig. 6) et ont présenté une morphologie conforme à celle du génotype de départ.

TABLEAU II

Effet de la température de culture sur le nombre de colonies (>5 cellules) par millilitre de milieu, pour 2 essais différents, après 10 et 8 semaines de culture. Les chiffres suivis de la même lettre ne diffèrent pas à P 0,05.

*Effect of plating temperature on the number of colonies (>5 cells) per milliliter, for 2 distinct experiments after 10 and 8 weeks of culture. Numbers followed by the same letter are not different at P. 0,05.*

	Température de culture (°C)		
	16	21	25
exp. I (10 semaines). . . . .	34,5 c	298,8 b	206,9 b
exp. II (8 semaines). . . . .	255,7 b	810,3 a	221,2 b

DISCUSSION ET CONCLUSION. — Pour la première fois il a été possible d'obtenir des plantes conformes à partir de protoplastes foliaires d'un orme champêtre cultivé *in vitro*. L'efficacité de la pectolyase Y 23 sur les espèces ligneuses ([14], [15]) a été confirmée. Le rendement en protoplastes est un des plus importants obtenus pour ces végétaux, il est 3 fois supérieur à celui rapporté pour les peupliers [2]. Des divisions ont été obtenues à partir du matériel issu de la multiplication *in vitro*, ce qui n'avait pas été possible avec celui préparé en serre ([12], [13]). Cette capacité particulière des plantes issues de la micropropagation a déjà été rapportée pour d'autres espèces ligneuses ([14], [16], [17]). Par ailleurs, l'état de compétence fugace des cellules sources, souvent noté ([16], [6]), a été retrouvé ici, puisque les feuilles jeunes, prélevées sur des plantes repiquées depuis 55 jours, sont les plus performantes. Enfin pour l'orme champêtre comme pour d'autres arbres, l'effet bénéfique sur les mitoses de l'obscurité ([14], [16]), du lait de coco [18] et d'un renouvellement partiel du milieu [2] a été observé. Par contre, alors que les températures généralement utilisées se situent entre 25 et 28°C [19], l'effet favorable d'une température de 21°C a été mis en évidence pour OcBa.

La méthodologie qui vient d'être décrite devrait pouvoir s'adapter à d'autres ormes, puisque 8 plantes viennent d'être régénérées à partir des protoplastes foliaires de l'hybride Dodoens. Toutefois l'utilisation de ce système pour la réalisation de manipulations génétiques n'est envisageable qu'après une amélioration substantielle de la division des protoplastes d'une part, et de la régénération de plantes d'autre part.

Les auteurs remercient M. Casenave, J. Lebœuf et I. Serpette pour leur assistance technique efficace.

Note remise le 20 août 91, acceptée le 30 septembre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] E. B. SMALLEY et D. T. LESTER, *HortScience*, 8, 1973, p. 514-515.
- [2] B. H. McCOWN et J. A. RUSSEL, *Cell and Tissue Culture in Forestry*, 2, J. M. BONGA et D. J. DURZAN éd., Nijhoff, 1987, p. 16-30.
- [3] C. SJÖDIN et K. GLIMELIUS, *Theor. Appl. Genet.*, 78, 1989, p. 513-520.
- [4] R. GAUTHERET, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 210, 1940, p. 632-634.
- [5] C. JACQUIOT, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 229, 1949, p. 529-530.
- [6] M. B. STICKLEN, S. C. DOMIR et R. D. LINEBERGER, *Plant Science*, 47, 1986, p. 29-34.
- [7] N. DORION, P. DANTHU et C. BIGOT, *Ann. Sci. For.*, 44, 1987, p. 103-118.
- [8] T. MURASHIGE et F. SKOOG, *Physiol. Plant.*, 15, 1962, p. 473-494.
- [9] R. HELLER, *Ann. Sci. Nat. Biol. Vég.*, 14, 1953, p. 141-143.
- [10] M. C. CHUPEAU, C. BELLINI, P. GUERCHE, B. MAISONNEUVE, G. VASTRA et Y. CHUPEAU, *Biol./Technology*, 7, 1989, p. 503-508.
- [11] G. MOREL et R. H. WETMORE, *Am. J. Bot.*, 38, 1951, p. 141-143.

- [12] N. DORION, B. GODIN et C. BIGOT, Protoplasts (poster proceedings), POTRYKUS et coll. éd., 6<sup>e</sup> International Protoplast Symposium, Bâle, 1983, p. 8-9.
- [13] P. DANTHU, Thèse 3<sup>e</sup> cycle, Univ. Paris-VI, 1986, 156 p.
- [14] S. OHKA et K. OHYAMA, *J. Plant Physiol.*, 119, 1985, p. 455-460.
- [15] A. WALLIN et L. JOHANSSON, *J. Plant Physiol.*, 135, 1989, p. 565-570.
- [16] M. A. L. SMITH et B. H. MCCOWN, *Plant Science Letters*, 28, 1982, 1983, p. 149-156.
- [17] S. J. OCHATT et J. B. POWER, *Plant Science*, 56, 1988, p. 75-79.
- [18] J. A. RUSSEL et B. H. MCCOWN, *Plant Cell Reports*, 7, 1988, p. 59-62.
- [19] Y. HIDANO et M. NIIZEKI, *Scientia Horticulturae*, 37, 1988, p. 201-216.

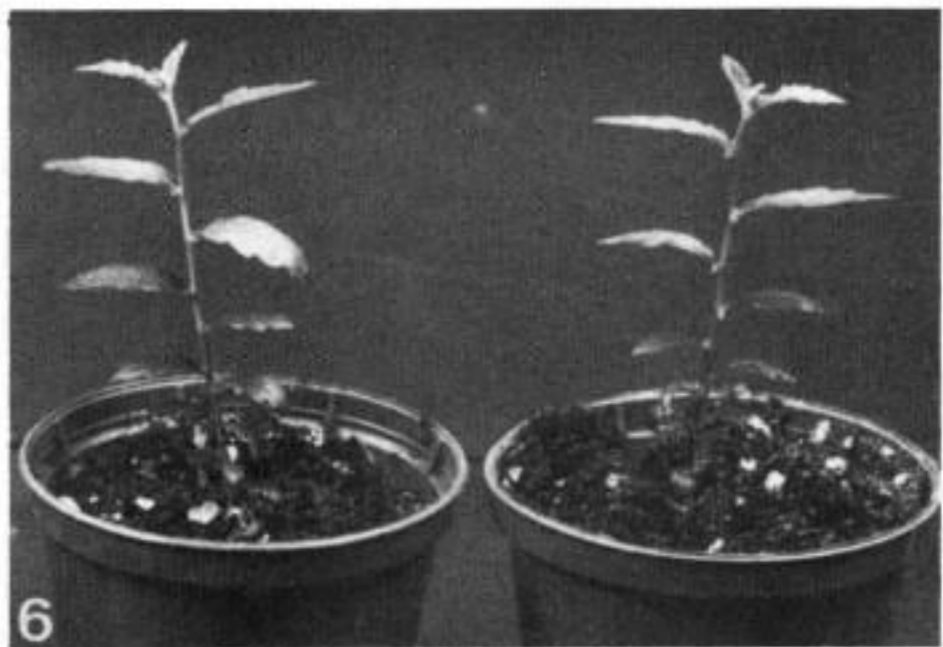
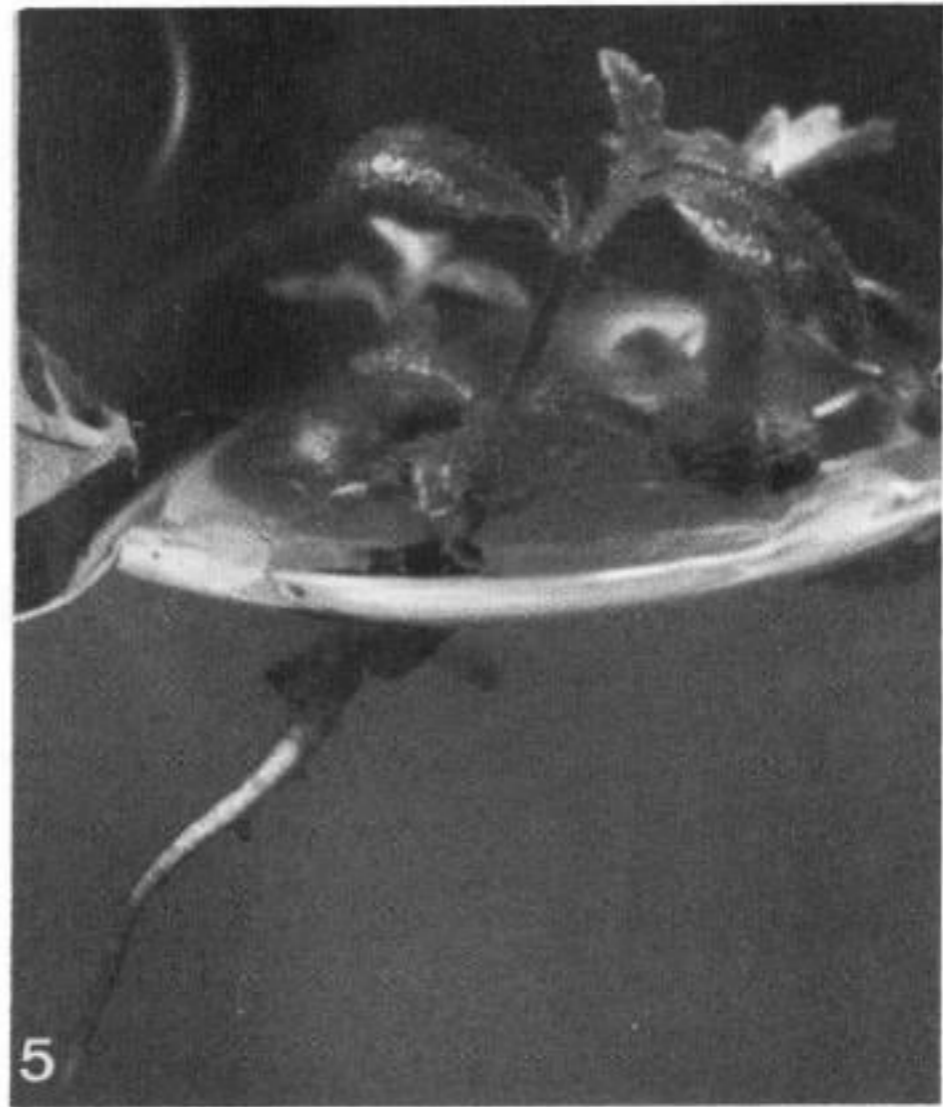
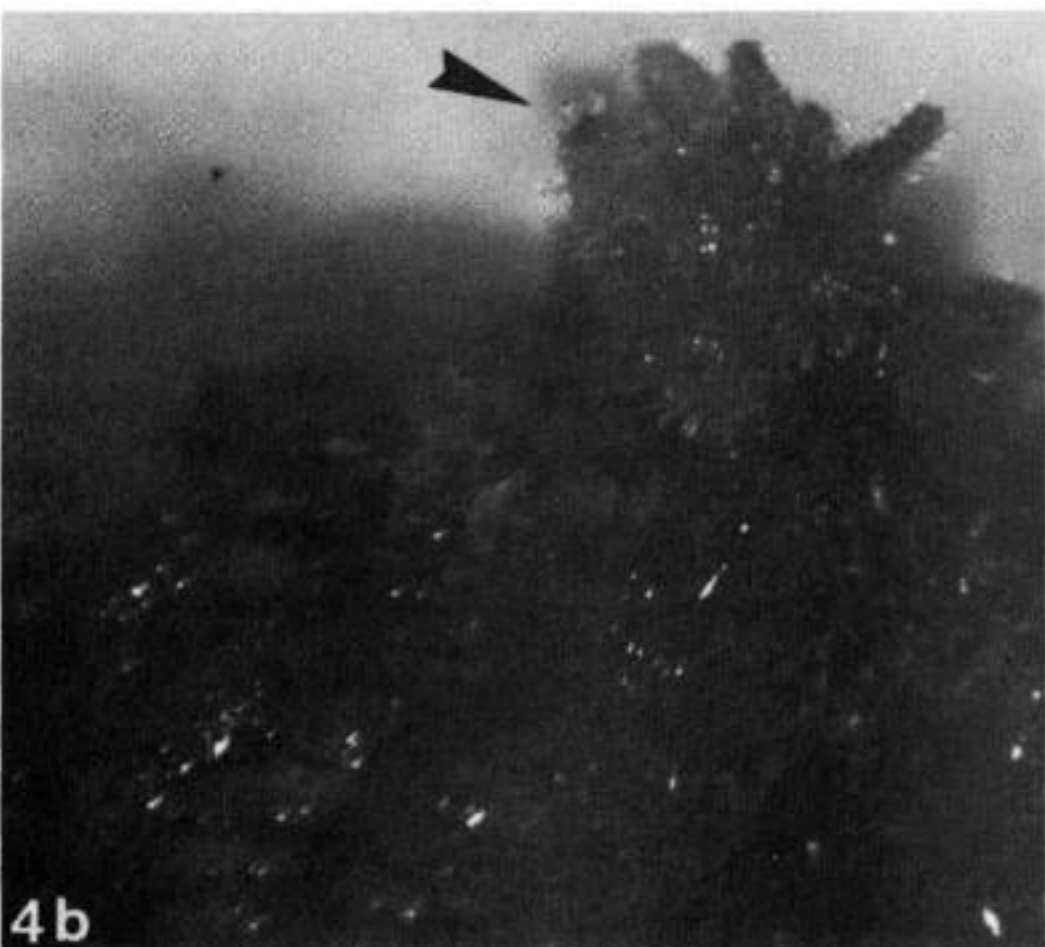
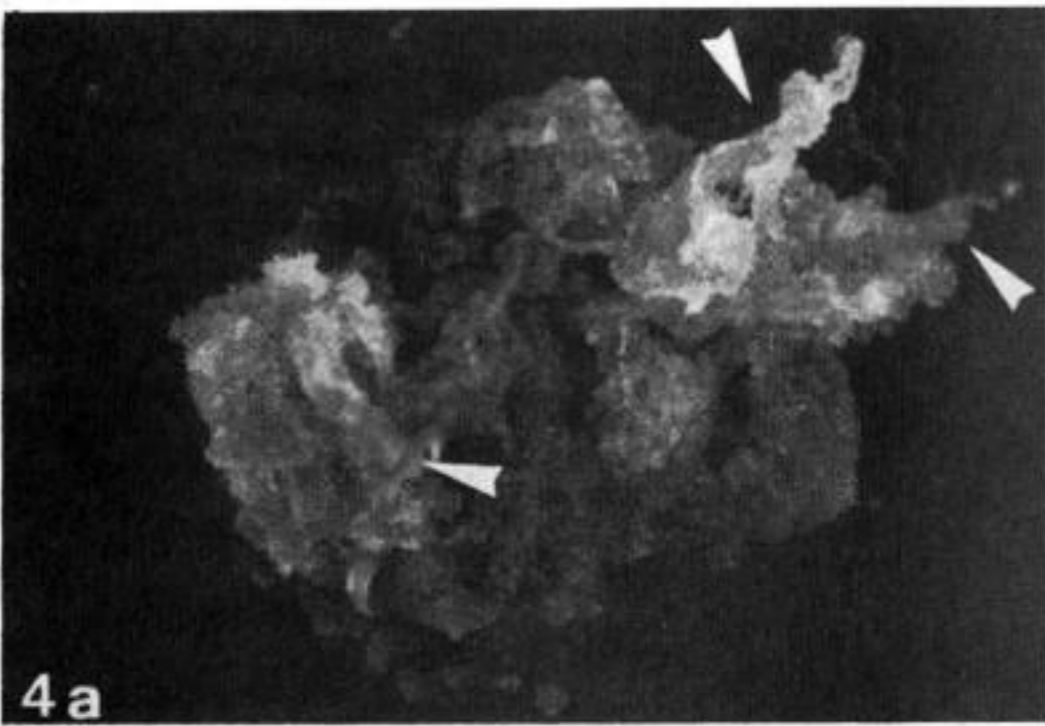
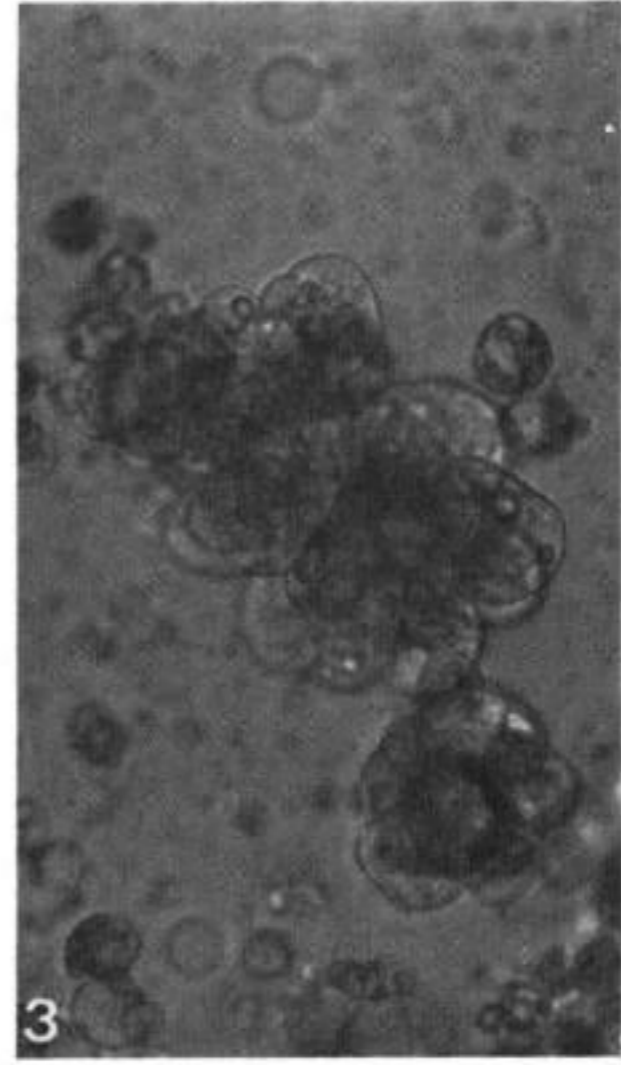
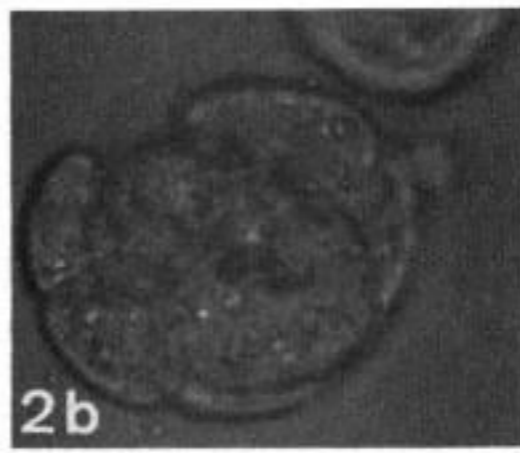
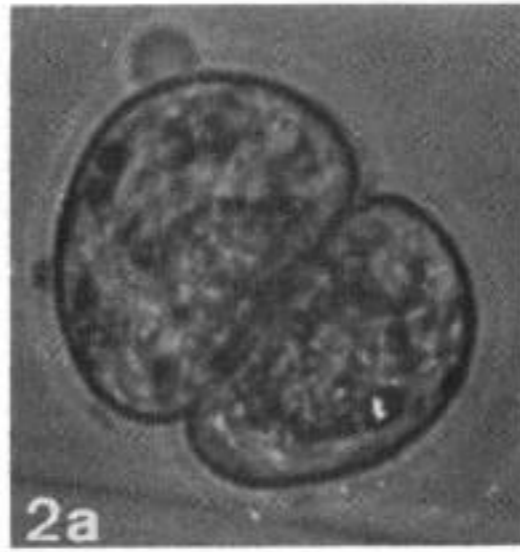
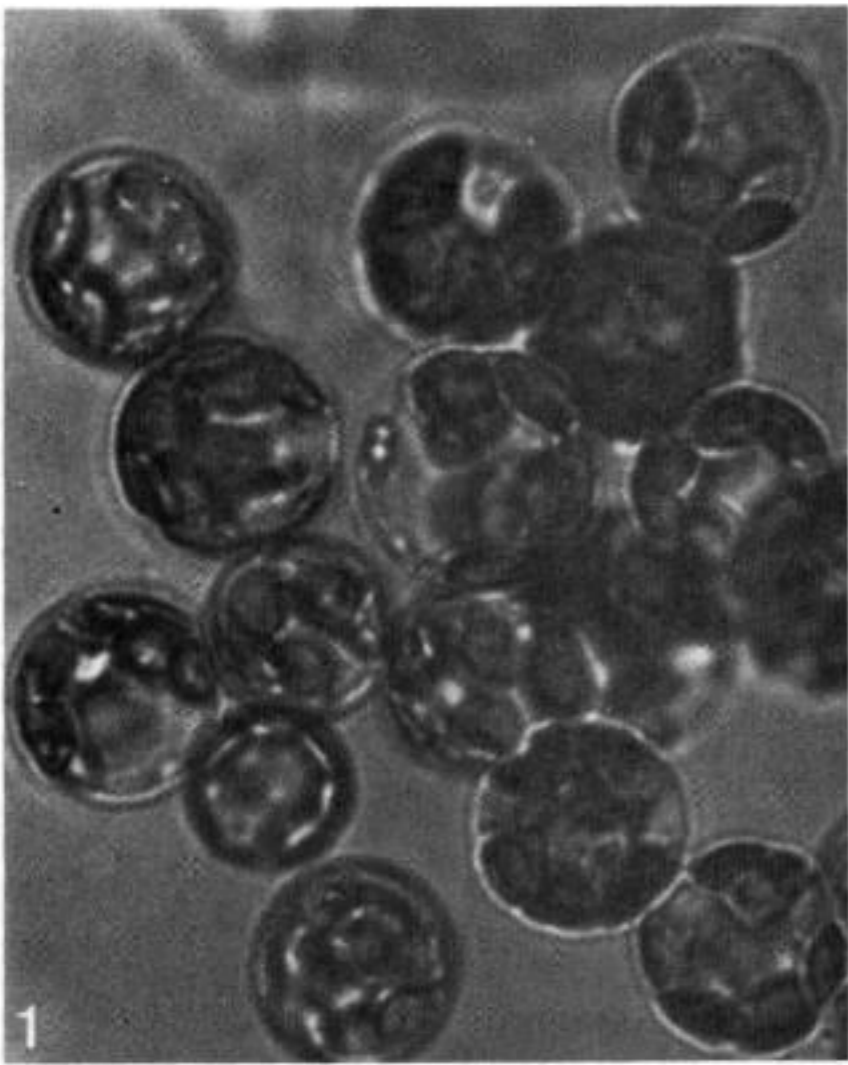
N. D., C. P., B. G. et C. B. : *Physiologie végétale appliquée, École nationale supérieure d'Horticulture*, R.P. n° 914, 78009 Versailles Cedex;

P. D. : *Mission C.T.F.T.-I.S.R.A.*, B.P. n° 2312, Dakar, Sénégal;

S. O. : *Lab. of Horticulture, Fukui prefectural College*, 97-21-3 Obatake-Cho, Fukui 910-Japon.

#### EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

- Fig. 1. — Protoplastes foliaires d'OcBa avant mise en culture (G × 950).  
 Fig. 1. — *Leaf protoplasts of OcBa just before plating (M × 950).*
- Fig. 2. — Premières divisions, a) après 4 jours (G × 1 050), b) après 7 jours (G × 950).  
 Fig. 2. — *First cell divisions, a) after 4 days (G × 1050), b) after 7 days (M × 950).*
- Fig. 3. — Colonies après 3 mois en milieu liquide (G × 120).  
 Fig. 3. — *Colonies after 3 months in liquid medium (M × 120).*
- Fig. 4. — Régénérations dans 2 cals (flèches), a) 7 mois (G × 4), b) 12 mois (G × 12,5).  
 Fig. 4. — *Regenerations from 2 calli (arrows), a) 7 months (M × 4), b) 12 months (M × 12.5).*
- Fig. 5. — Enracinement et allongement des pousses néoformées.  
 Fig. 5. — *Rooting and elongation of neoformed plants.*
- Fig. 6. — Plantes en croissance (5 cm) après 1 mois d'acclimatation.  
 Fig. 6. — *Growing plants (5 cm) after 1-month's acclimatization.*





## Contrôle par la progestérone du sulfate intracellulaire disponible dans les cellules épithéliales glandulaires de l'endomètre en culture

Abderrahim MAHFOUDI, Laurent BECK, Monique NICOLLIER, Véronique COOSEMANS  
et Gérard ADESSI

**Résumé** – L'incorporation du sulfate a été mesurée dans les subcultures de cellules épithéliales glandulaires de l'endomètre de cobaye, traitées par l'estradiol seul ou en association avec la progestérone. La progestérone augmente significativement l'incorporation du sulfate dans les macromolécules cellulaires et sécrétées. Cependant l'augmentation la plus importante se manifeste au niveau du sulfate intracellulaire disponible pour la sulfatation. Nous mettons en évidence que cet effet est corrélé au pourcentage de cellules exprimant *in vitro* des récepteurs de la progestérone.

### Progesterone control of the available sulfate pool in cultured guinea-pig glandular epithelial cells

**Abstract** – Sulfate incorporation was measured in subcultured glandular epithelial cells from guinea-pig endometrium, treated by estradiol alone or in concert with progesterone. Progesterone significantly increased sulfate incorporation in cellular and secreted macromolecules. However, the greatest effect of progesterone was on the size of the intracellular sulfate pool available for sulfation. This effect of progesterone was correlated with the percentage of cells exhibiting progesterone receptors *in vitro*.

**Abridged English Version** – During the estrous cycle, the endometrium undergoes profound changes under the action of ovarian hormones. Following a proliferative phase dominated by the action of estradiol ( $E_2$ ) and ovulation, a secretory phase ensues, in which progesterone acts to prepare endometrium for embryo implantation. The secretory material released by endometrial glandular epithelial cells (GEC) may play an essential role in providing suitable components for the blastocysts [1]. We have previously reported a progesterone effect on sulfated components in guinea-pig uterus ([2], [3]). Progesterone significantly stimulated the secretion of sulfated proteins, especially tyrosine sulfated proteins [3]. It was thought important to pursue this study in GEC which could be the target cells for this hormonal effect. Thus, we took advantage of a culture system which has recently been described [4]. This culture system consisted of homogeneous populations of glandular epithelial cells subcultured on a basement membrane matrix in a serum-free, chemically defined medium (CDM).

This study was focused on the effect of progesterone on sulfate incorporation in GEC subculture in CDM and primed with  $10^{-8}$  M  $E_2$ . Endometrial glands were isolated from uteri of mature female guinea-pigs as described by Chaminadas *et al.*, [5] and cultured as recently reported by Mahfoudi *et al.*, [4]. GEC subculture in CDM containing  $10^{-8}$  M  $E_2$  reached confluency after 4 days of subculture. The content in the progesterone receptors (PRs) was determined as described by Perrot-Appianat *et al.*, [6] modified as previously reported by Chaminadas *et al.*, [7]. After confluency,  $E_2$ -primed GEC were incubated in CDM containing  $E_2$  alone or associated with various concentrations of progesterone. At different times during hormone treatment GEC were labelled with  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$  added to the sulfate-free CDM with the corresponding hormones, for a period of 15 hrs. Cellular material was extracted using lysis solution containing 9 M urea, 3% (v/v) Nonidet P 40 and protease

Note présentée par Étienne-Émile BAULIEU.



inhibitors as reported by Dutt *et al.*, [8]. Sulfate incorporation was measured in cellular material and after gel filtration chromatography on Sephadex G-25 in cellular and secreted macromolecules. Radioactivity was expressed as counts per minute per microgramme of cellular proteins quantified by the method of Lowry *et al.*, [9]. Available intracellular sulfate pool (AISP) was expressed as  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$  measured in total cellular material minus  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$  incorporated in cellular macromolecules. All the studies were conducted with confluent cells after 4 days of subculture in CDM containing  $10^{-8}$  M  $\text{E}_2$ . In order to appreciate the progesterone responsiveness of GEC, PR content was determined. After the first 4 days of subculture, PRs were exclusively located in nuclei. The percentage of immunolabelled nuclei averaged 50% (*Fig. 1*) and no significant variation in this percentage was observed in subcultures prolonged for 48 hrs. When  $10^{-7}$  M progesterone was added to CDM containing  $\text{E}_2$ , there was a significant decrease in the percentage of immunolabelled nuclei after 24 hrs. of treatment and no immunolabelled nuclei were detected after 36 hrs. Consequently the progesterone effect was tested within the first 24 hrs. Thus, sulfate incorporation was compared in GEC-treated with  $10^{-8}$  M  $\text{E}_2$  alone or associated with increasing progesterone concentrations ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M) within 23 hrs. when the percentage of cells exhibiting PRs was still high.  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$  was added to the medium during the last 15 hrs. of hormone treatment. Figure 2 shows a dose-dependent effect of progesterone on sulfate incorporation in all fractions tested. Maximum effect was obtained for  $10^{-8}$ - $10^{-7}$  M progesterone concentrations and the highest increase was in AISP (4.5-fold compared with  $\text{E}_2$ -treated cells). When  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$  was added to CDM 24 hrs. after progesterone treatment, and the percentage of cells immunolabelled for PRs was very low, AISP was weakly increased in the cells treated with  $\text{E}_2$  plus progesterone and did not vary whatever the progesterone concentration used. Thus, the progesterone effect on AISP seemed to be correlated with the percentage of cells exhibiting PRs in GEC. When this percentage was high, progesterone produced a dose-dependent effect on AISP. When the percentage was reduced, no dose-effect of progesterone was detectable. These results show a specific effect of progesterone on the size of the intracellular sulfate pool available for protein sulfation. This specific effect of progesterone was correlated with the percentage of cells exhibiting PRs.

---

Pendant le cycle œstrien, l'endomètre subit des changements profonds sous l'action des hormones ovariennes. Les estrogènes au cours de la phase proliférative puis la progestérone en phase sécrétoire concourent à la différenciation de l'endomètre pour le rendre apte à l'implantation de l'embryon. Le matériel sécrété par les cellules épithéliales glandulaires (CEG) de l'endomètre peut jouer un rôle essentiel en fournissant des éléments nécessaires aux blastocystes [1]. Nous avons décrit antérieurement un effet de la progestérone sur les composants sulfatés dans l'utérus de cobaye ([2], [3]). La progestérone augmente la sécrétion des protéines sulfatées et particulièrement la synthèse et la sécrétion des protéines sulfatées sur la tyrosine [3]. Il nous a semblé important de poursuivre cette étude sur les CEG qui peuvent être les cellules cibles pour cet effet spécifique de la progestérone. Pour cela, nous avons développé un système de culture des CEG sur une membrane basale reconstituée [4]. Leur subculture dans un milieu chimiquement défini, sans sérum, permet d'obtenir une population homogène de CEG (plus de 90 % de cellules épithéliales). Nous avons donc utilisé ce modèle pour étudier l'action de la progestérone sur l'incorporation du sulfate dans les CEG.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — Les uteri ont été prélevés sur les cobayes albinos femelles de souche Dunkin Hartley provenant de Charles River France. Les glandes endométriales ont été isolées selon la technique décrite par Chaminadas et coll., [5] et cultivées selon le procédé récemment publié par Mahfoudi et coll., [4]. Brièvement, après une culture primaire dans un milieu Ham's F-12 contenant 5 % de sérum de veau foetal, les cellules ont été mises en subculture sur des boîtes de plastiques recouvertes de Matrigel (Sochibo, France) dans un milieu sans sérum, chimiquement défini (MCD) constitué de milieu Ham's F-12 enrichi, contenant de l'estradiol ( $E_2$ ;  $10^{-8}$  M). Les cellules atteignaient la confluence au bout de 4 jours environ et la présence de récepteurs de la progestérone (RPs) intranucléaires a été évaluée selon la méthode décrite par Perrot-Appianat et coll., [6] modifiée par Chaminadas et coll., [7]. Le pourcentage de cellules présentant des noyaux immunomarqués a été déterminé sur une série de quatre subcultures différentes. Le pourcentage de cellules épithéliales a été apprécié par immunomarquage indirect à l'aide d'un anticorps anticytokératine [7]. Quand les cellules atteignaient la confluence, elles ont été incubées pendant 23 h dans le MCD contenant  $E_2$  ( $10^{-8}$  M) seul ou associé à la progestérone à des concentrations variables. 15 h avant la fin du traitement par les hormones, le MCD a été remplacé par du MCD sans sulfate contenant 15,4 MBq/ml de  $[^{35}\text{S}]\text{-Na}_2\text{SO}_4$  (act. spéc. 41 TBq/mmol, N.E.N., France) en présence des hormones correspondantes et l'incubation a été poursuivie jusqu'à la 23<sup>e</sup> heure. Les temps d'exposition à la progestérone et d'incubation avec le  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$  ont été établis dans une étude préliminaire pour obtenir une réponse maximale des CEG. Pour mesurer l'incorporation du  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$  dans les produits de sécrétion, les milieux (1 ml/boîte) ont été centrifugés à  $3\,500 \times g$  pendant 20 mn et le surnageant a été divisé en fractions de 200  $\mu\text{l}$ . Après lavage des cellules avec du PBS (3 fois par 5 ml), les cellules ont été traitées par un tampon de lyse contenant de l'urée 9 M, du Nonidet P 40 à 3 % (v/v) et un mélange d'inhibiteurs de protéases comme décrit par Dutt et coll., [8]. Les macromolécules marquées des lysats cellulaires et des milieux ont été isolées par chromatographie de gel filtration sur une colonne de Sephadex G-25 (fine) (Pharmacia, France), équilibrée dans un tampon Tris-acétate 20 mM pH 7,0 contenant de l'urée 6 M, 0,2 % (v/v) de Triton X 100 et 0,03 % (v/v) d'azide de sodium. La radioactivité a été mesurée dans une partie aliquote des lysats cellulaires et dans les fractions de macromolécules cellulaires et sécrétées par comptage en scintillation liquide en utilisant un appareil Tri-Carb modèle 460 C (Packard) et exprimée en impulsions ou coups par minute par microgramme de protéines cellulaires, dosées par la méthode de Lowry et coll., [9]. La quantité intracellulaire de sulfate disponible (QISD) a été alors exprimée en soustrayant du  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$  cellulaire total, le  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$  incorporé dans les macromolécules cellulaires. Les différences statistiques ont été déterminées en utilisant une analyse de variance avec test de comparaisons multiples en prenant  $P < 0,05$  pour seuil de significativité.

**RÉSULTATS ET DISCUSSION.** — Toutes les études ont été conduites sur des cellules confluentes après 4 jours de subculture dans le MCD contenant  $E_2$  ( $10^{-8}$  M). Dans ces conditions, 90 à 95 % des cellules confluentes montrent une réaction positive après immunomarquage indirect avec l'anticorps anticytokératine. Afin d'apprécier l'hormono-dépendance à la progestérone des CEG, le pourcentage de cellules exprimant des RPs a été déterminé. Après 4 jours de subculture, 50 % des cellules sont immunomarquées pour les RPs (*fig. 1*). L'immunomarquage est toujours nucléaire sans marquage cytoplasmique et le pourcentage de noyaux marqués ne varie pas quand le temps de traitement avec  $E_2$  est prolongé jusqu'à 48 h. Quand la progestérone ( $10^{-7}$  M) est ajoutée dans le milieu contenant  $E_2$  ( $10^{-8}$  M), après le 4<sup>e</sup> jour de subculture, une diminution hautement significative du pourcentage de noyaux immunomarqués est observée 24 h après l'addition de progestérone. Après 36 h, plus aucun immunomarquage n'est détectable. C'est pourquoi, l'effet de la progestérone sur les CEG a été étudié durant les premières 23 h de traitement avec cette hormone. Durant cette période il persiste un nombre significatif de cellules exprimant des RPs.

Afin d'étudier l'action de la progestérone, les subcultures de cellules confluentes ont été incubées dans le MCD contenant  $E_2$  ( $10^{-8}$  M) associé à des concentrations variables de progestérone ( $10^{-10}$  à  $10^{-6}$  M). Les cellules contrôles ont été incubées en présence de  $E_2$  seul. Après 8 h d'incubation avec les hormones, le  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$  a été ajouté en présence des hormones correspondantes et les incubations ont été poursuivies pendant une nouvelle période de 15 h. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 2. Un

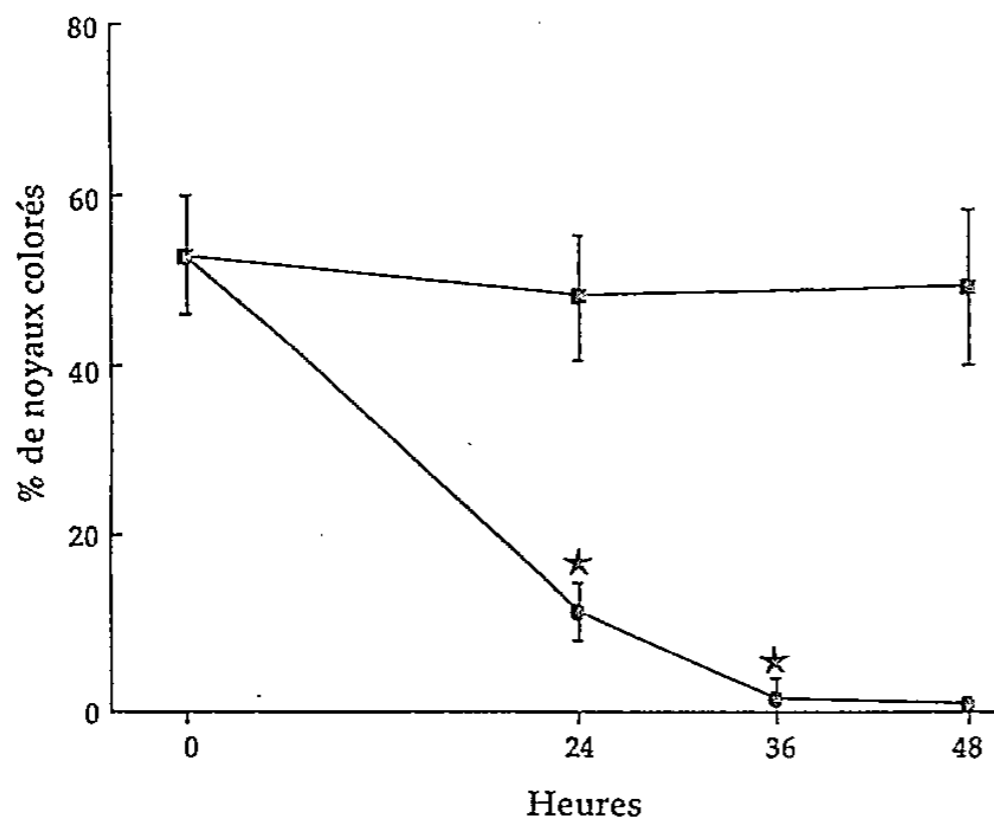


Fig. 1

Fig. 1. — Effet de la progestérone sur le pourcentage de cellules exprimant des récepteurs de la progestérone. Les cellules épithéliales glandulaires sont subcultivées sur des boîtes recouvertes de Matrigel, dans un milieu chimiquement défini. Le pourcentage de cellules exprimant des récepteurs de la progestérone a été calculé à confluence (0 h) et à post-confluence (24, 36, 48 h). La progestérone ( $10^{-7}$  M) a été ajoutée (—●—) ou non (—■—) aux milieux de culture contenant de l'estradiol ( $10^{-8}$  M) à 0 h. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  écart-type des valeurs obtenues à partir de quatre séries de cultures. \*  $P < 0,05$  vs traitement avec l'estradiol.

Fig. 1. — Progesterone effect on the percentage of cells exhibiting progesterone receptors in glandular epithelial cells. The percentage of progesterone receptor-immunolabelled nuclei was calculated in confluent (0 hr.) and postconfluent (24, 36, 48 hrs.) subcultures on Matrigel-coated dishes in hormonally defined medium. Progesterone ( $10^{-7}$  M) was added (—●—) or not added (—■—) to the culture media containing estradiol ( $10^{-8}$  M) at 0 hr. Data are the mean  $\pm$  SEM from quadruplicate cultures. \*  $P < 0.05$  vs estradiol treatment.

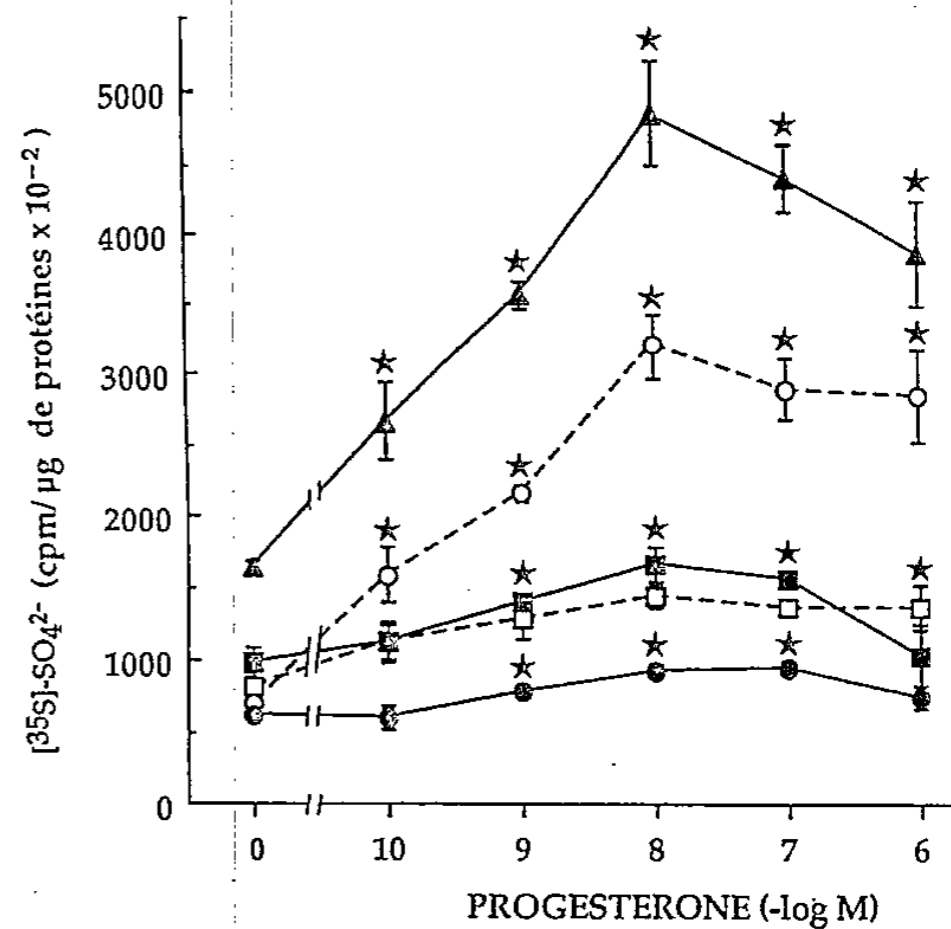


Fig. 2

Fig. 2. — Courbes dose-réponse de l'action de la progestérone sur l'incorporation du sulfate. Après la confluence, les cellules ont été traitées pendant 23 h avec l'estradiol ( $10^{-8}$  M) seul (0) ou en association avec la progestérone à concentration croissante ( $10^{-10}$  M- $10^{-6}$  M). L'incorporation du sulfate a été mesurée dans le matériel cellulaire (—▲—) ou dans les macromolécules cellulaires (—■—) ou sécrétées (—●—) comme il est décrit dans Matériel et Méthodes. La quantité de sulfate disponible dans les cellules traitées par les hormones pendant 23 h (—○—) ou 39 h (—□—) a été calculée en soustrayant le sulfate incorporé dans les macromolécules cellulaires du sulfate cellulaire. La moyenne  $\pm$  écart-type a été calculée à partir de trois déterminations pour chaque point sur trois cultures séparées. \*  $P < 0,05$  vs traitement par l'estradiol (0).

Fig. 2. — Dose-dependent effect of progesterone on sulfate incorporation in glandular epithelial cells. When the cells reached confluency, they were treated for 23 hrs. by  $10^{-8}$  M estradiol alone (0) or with progesterone at increasing concentrations ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M). Sulfate incorporation was measured in total cellular material (—▲—) or in secreted (—●—) and cellular (—■—) macromolecules as described in "Materials and Methods". Available intracellular sulfate pool in the cells treated by the hormones for 23 hrs. (—○—) or 39 hrs. (—□—) was calculated by subtracting the sulfate incorporated in cellular macromolecules from that in total cellular material. The mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations at each point from at least three separate cultures is presented. \*  $P < 0.05$  vs estradiol treatment (0).

effet de la progestérone en fonction de sa concentration, sur l'incorporation du  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$  est observé dans toutes les fractions étudiées *i.e.* les lysats cellulaires, les macromolécules cellulaires et sécrétées et la QISD. L'effet maximal est observé pour les concentrations égales ou supérieures à  $10^{-8}$  M de progestérone. Par rapport aux contrôles sans progestérone, cette hormone à la concentration de  $10^{-8}$  M, augmente de 2,9 et 4,5 fois l'incorporation du sulfate respectivement dans les lysats cellulaires et dans la

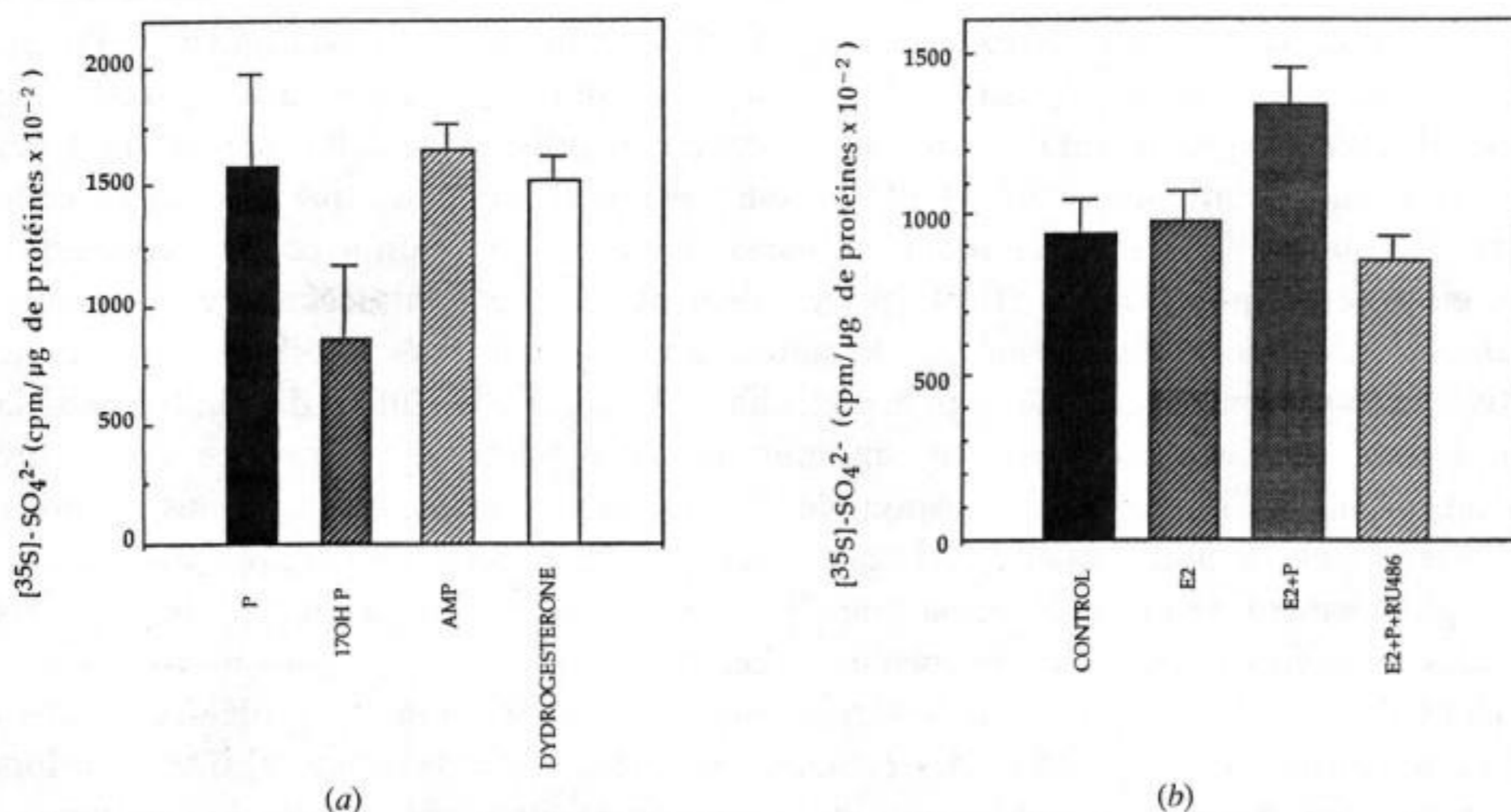


Fig. 3. — *a.* Effet comparé de la progestérone et des progestagènes sur la quantité de sulfate disponible. Les cellules sont traitées pendant 23 h avec l'estradiol ( $10^{-8}$  M) en association avec la progestérone ( $10^{-8}$  M) (P) ou le 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone ( $10^{-8}$  M) (17OHP) ou l'acétate de médroxyprogestérone ( $10^{-8}$  M) (AMP) ou la dydrogesterone ( $10^{-8}$  M). *b.* Effet comparé de la progestérone et du stéroïde antiprogestérone RU486 sur la quantité de sulfate disponible. Les cellules ont été traitées pendant 23 h avec l'estradiol ( $E_2$ ) ( $10^{-8}$  M) seul ou en association avec la progestérone ( $10^{-8}$  M) ( $E_2 + P$ ) ou progestérone plus le RU486 ( $5 \cdot 10^{-7}$  M) ( $E_2 + P + \text{RU486}$ ) ou non traitées (control).

Fig. 3. — *a.* Compared effect of progesterone and progestins on the available intracellular sulfate pool. Cells were treated for 23 hrs. by  $10^{-8}$  M estradiol with  $10^{-8}$  M progesterone (P) or  $10^{-8}$  M 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17OHP) or  $10^{-8}$  M medroxyprogesterone acetate (AMP) or  $10^{-8}$  M dydrogesterone. *b.* Compared effect of progesterone and steroid antiprogestosterone RU486 on the available intracellular sulfate pool. Cells were treated for 23 hrs. with  $10^{-8}$  M estradiol ( $E_2$ ) alone or in association with  $10^{-8}$  M progesterone ( $E_2 + P$ ) or progesterone plus  $5 \times 10^{-7}$  M RU486 ( $E_2 + P + \text{RU486}$ ) or untreated (control).

QISD. Ainsi, l'effet le plus important de la progestérone se situe au niveau de la QISD et seule la QISD a été analysée dans la suite de cette étude.

L'effet de la progestérone ( $10^{-8}$  M) sur la QISD est totalement aboli par le stéroïde antiprogestérone, RU486 ( $5 \cdot 10^{-7}$  M). L'acétate de médroxyprogestérone ( $10^{-8}$  M) et la dydrogesterone ( $10^{-8}$  M) ont une action identique à celle de la progestérone. Par contre la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone n'a pas d'effet sur la QISD (fig. 3 *a* et *b*).

Nous avons voulu rechercher l'effet de la progestérone sur des cultures ayant un faible pourcentage de noyaux exprimant par immunomarquage des RPs. Nous avons donc analysé l'effet de l'hormone en fonction de sa concentration, en commençant l'incorporation du sulfate après 24 h d'action de l'hormone sur les cellules lorsque le pourcentage de cellules exprimant des RPs était inférieur à 11 %. La durée totale de l'incubation a été de 39 h dont les 15 dernières en présence du  $[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4^{2-}$ . La QISD est alors légèrement augmentée sous l'effet de la progestérone (1,5 fois par rapport aux cellules traitées avec  $E_2$  seul) (fig. 2). Cependant, la QISD ne varie pas en fonction de la concentration de progestérone utilisée. Ainsi l'effet-dose de cette hormone n'apparaît que lorsqu'il existe un pourcentage significatif de cellules exprimant des RPs. Ces résultats mettent en évidence l'importance, *in vitro*, de contrôler le pourcentage de cellules exprimant des RPs pour étudier l'action de la progestérone. Lorsque ce pourcentage est trop faible il existe

certes un effet de la progestérone par rapport au contrôle sans progestérone mais l'effet-dose de l'hormone n'est pas visible. En considérant qu'un effet-dose de la progestérone n'est observable que lorsqu'il existe un pourcentage suffisant de cellules exprimant des RPs et l'action d'inhibition du RU486, il est possible de conclure que l'action de cette hormone sur la QISD passe au moins en partie par son interaction avec ses récepteurs.

L'effet de la progestérone affecte principalement le sulfate intracellulaire disponible. Dans la cellule, il est représenté par le sulfate libre entrant dans la cellule et le sulfate activé, le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate c'est-à-dire le sulfate disponible pour la sulfatation. A notre connaissance, un effet de la progestérone sur l'une ou l'autre partie du sulfate intracellulaire disponible n'a jamais été décrit. Nous avons rapporté précédemment un effet similaire de la progestérone dans l'utérus de cobaye mais cet effet était globalement de moindre amplitude [3]. Ces résultats permettent d'envisager que les cellules épithéliales sont les cibles mêmes de cet effet.

Dans l'utérus de cobaye, la progestérone augmente la sécrétion des protéines sulfatées [2] et la synthèse et la sécrétion des protéines sulfatées sur la tyrosine [3]. De plus, lors de la phase sécrétoire, lorsque le taux de progestérone circulante est élevé, l'endomètre subit de nombreux changements et parmi ceux-ci, plus particulièrement une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de constituants sulfatés ([10], [11], [12]). Ainsi, en phase sécrétoire, l'endomètre a un besoin accru de sulfate. L'augmentation, induite par la progestérone, de la quantité de sulfate intracellulaire disponible pour les activités sulfo-transférasiques, peut entraîner une augmentation de la sulfatation des constituants nécessaires à l'implantation des blastocystes.

*En conclusion*, nos résultats montrent que la progestérone provoque l'augmentation du sulfate intracellulaire disponible pour la sulfatation. Nous poursuivons cette étude par l'analyse de l'effet de l'hormone sur l'influx du sulfate dans les CEG.

Note remise le 3 juin 1991, acceptée après révision le 3 octobre 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. M. ROBERTS et F. W. BAZER, *J. Reprod. Fert.*, 82, 1988, p. 875-892.
- [2] M. C. THIARD, M. NICOLLIER, A. MAHFOUDI et G. L. ADESSI, *J. Reprod. Fert.*, 87, 1989 a, p. 687-697.
- [3] M. C. THIARD, M. NICOLLIER, A. MAHFOUDI, B. CORMERY et G. L. ADESSI, *Cell. Mol. Biol.*, 35, 1989 b, p. 199-205.
- [4] A. MAHFOUDI, M. NICOLLIER, A. Y. PROPPER, S. COUMES-MARQUET et G. L. ADESSI, *Biol. Cell.*, 1991 (sous presse).
- [5] G. CHAMINADAS, M. ALKHALAF, J. P. REMY-MARTIN, A. Y. PROPPER et G. L. ADESSI, *J. Endocrinol.*, 123, 1989, p. 233-241.
- [6] M. PERROT-APPLANAT, F. LOGEAT, M. T. GROUYER-PICARD et E. MILGROM, *Endocrinology*, 116, 1985, p. 1473-1484.
- [7] G. CHAMINADAS, A. Y. PROPPER, M. ROYEZ, O. PROST, J. P. REMY-MARTIN et G. L. ADESSI, *J. Reprod. Fert.*, 77, 1986, p. 547-558.
- [8] A. DUTT, J. P. TANG, J. K. WELPLY et D. D. CARSON, *Endocrinology*, 118, 1986, p. 661-673.
- [9] O. H. LOWRY, M. J. ROSEBROUGH, A. L. FAAR et R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p. 265-275.
- [10] B. J. BUIRCHELL et R. HAHNEL, *J. Steroid Biochem.*, 6, 1975, p. 1489-1494.
- [11] M. E. HOADLEY, M. W. SEIF et J. D. APLIN, *Biochem. J.*, 266, 1990, p. 757-763.
- [12] K. KUBUSHIRO, K. KOJIMA, M. MITAMI, S. MOZAWA, R. IISUKA, M. IWAMORI et Y. NAGAI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 268, 1989, p. 129-136.

## Stability of CD4/CD8 ratios in man: New correlation between CD4/CD8 profiles and iron overload in idiopathic haemochromatosis patients

Raquel REIMÃO, Graça PORTO and Maria de SOUSA

**Abstract** – The proportions of CD4+, CD8+ cells were determined in peripheral blood samples obtained from 27 patients with idiopathic haemochromatosis and 67 healthy controls. Samples from the patients were obtained at the start of therapy and at intervals during intensive phlebotomy treatment in which 400 ml of blood are removed each week for 6 months to 2 years. Patients varied in their CD4/CD8 ratios from 0.8 to 4.2. An individual's CD4/CD8 ratio, however, remained unaffected by the repeated removal of large volumes of blood by phlebotomy confirming the existence of a homeostatic regulation of the relative numbers of the two major peripheral T cell pools in man. Follow-up of iron reentry into the transferrin pool at the end of the intensive phlebotomy treatment indicates that the relative proportion of circulating CD4/CD8 cells is critically related to the regulation of iron absorption.

### Stabilité des rapports des lymphocytes CD4/CD8 chez l'homme : une nouvelle corrélation entre profils CD4/CD8 et degré de surcharge de fer chez des malades avec l'hémochromatose héréditaire

**Résumé** – Les proportions de lymphocytes CD4 et CD8 ont été déterminées dans des échantillons de sang périphérique de 27 malades avec Hémochromatose Héréditaire et 67 donneurs de sang. Les échantillons des malades ont été obtenus au début du traitement et périodiquement pendant le traitement intensif par phlébotomies, pendant lequel 400 ml de sang sont recueillis chaque semaine au cours de 6 mois à 2 années. Les rapports CD4/CD8 dans le groupe des malades étaient variables (0.8 à 4.2). Pourtant, dans chaque individu ce rapport CD4/CD8 n'était pas affecté par le prélèvement répété d'une quantité considérable de sang, confirmant l'existence d'une régulation homéostatique du nombre relatif des deux principales populations lymphocytaires chez l'homme. En suivant la rentrée de fer dans la transferrine à la fin du traitement intensif par phlébotomie, on constate que la proportion relative des cellules CD4/CD8 est associée de façon critique à l'absorption du fer.

**Version française abrégée** – Des études sur la dynamique des populations lymphocytaires chez la souris ont démontré que presque une moitié des lymphocytes T en circulation ont une demie vie courte et sont rapidement renouvelés à la périphérie ([1]-[6]). Des études comparables chez l'homme sont pratiquement impossibles. L'interprétation des résultats serait compliquée par les problèmes apportés par des transferts cellulaires ou l'administration de drogues cytostatiques. Dans cette Note on présente les résultats d'une étude des deux principales populations lymphocytaires T chez 27 malades affectés d'hémochromatose, au cours d'intervalles réguliers durant la thérapie par phlébotomie. L'hémochromatose, une maladie génétique de la régulation de l'absorption du fer, liée au système HLA [7], est un modèle naturel de surcharge de fer, sans les complications apportées par les transfusions sanguines multiples dans le système immunologique [8]. Cette surcharge est corrigée par des prélèvements répétés de sang. Le prélèvement répété de grandes quantités de sang permet d'analyser les variations dans les populations lymphocytaires, ses proportions et les nombres totaux en circulation.

Les populations CD4 et CD8 ont été caractérisées chez les patients et dans un groupe contrôle constitué par 67 donneurs de sang, par la méthode APAAP (immunocytochimie) et par cytofluorométrie (Profile II, Coulter). Les proportions de cellules T étaient différentes entre hommes et femmes dans la population contrôle (tableau I), les femmes montrant des

Note présentée par Raymond LATARJET.

pourcentages plus élevés de cellules CD4+ que les hommes ( $p < 0,001$ ). Pour cette raison, les comparaisons entre patients et contrôles ont été faites dans chaque groupe séparément. Les proportions relatives des lymphocytes T n'ont pas été influencées par l'âge dans aucun groupe. Parmi les patients affectés d'hémochromatose, les déterminations sérielles ont montré que chaque rapport individuel CD4/CD8 restait stable (*fig. 2*). Pour chaque patient les valeurs moyennes des déterminations sérielles ont été ainsi considérées; les pourcentages des cellules CD4+ et CD8+ variaient de 30 à 62 et de 13 à 39 respectivement, donnant des rapports CD4/CD8 de 0,8 à 4,2 (*fig. 1*). Des différences statistiquement significatives ont été observées entre patients et contrôles (tableau I): la moyenne de groupe des rapports CD4/CD8 et le pourcentage des cellules CD4 étaient plus élevés de façon significative chez les patients ( $p = 0,03$  et  $p = 0,007$  respectivement). L'analyse des résultats individuels indiquent que chez 10 patients mâles (patients 1-10) les ratios CD4/CD8 étaient anormalement élevés, avec des valeurs au-dessus de 2,9 (maximum du valeur contrôle). Les 17 patients restants avaient des ratios de CD4/CD8 dans les limites des valeurs contrôles.

Les niveaux de la ferritine sérique et de la saturation de la transferrine ont été suivis chez les deux groupes de patients (avec des ratios CD4/CD8 élevés ou normaux) durant la première année succédant à la fin du traitement intensif. La réapparition du fer sérique évidente par le niveau d'accroissement de la saturation de la transferrine se produit de façon plus marquée et à un niveau plus rapide parmi les patients aux ratios CD4/CD8 élevés plus que chez ceux aux ratios normaux. Cela s'est produit en dépit d'un rétablissement similaire du niveau de l'hémoglobine dans les deux groupes (*fig. 3*).

La nature de cette corrélation reste à élucider. Nous devons peut-être concentrer notre attention sur le duodenum où se produisent à la fois l'expansion des cellules CD8 ainsi que l'absorption du fer.

---

INTRODUCTION. — Studies of the dynamics of the renewal of lymphoid cell populations in the mouse have demonstrated that approximately half of the peripheral T lymphocytes have a short half-life and are rapidly renewed in the periphery ([1]-[6]). Comparable studies in man are practically impossible because the interpretation of the results would be complicated by the underlying diseases requiring cell transfer or the administration of cytostatic drugs. Idiopathic haemochromatosis, a genetic disorder of the regulation of iron absorption linked to HLA [7], represents a natural model of overload of the non-haem iron pool uncomplicated by the effects of multiple blood transfusion on the immunological system [8]. Correction of the excessive iron balance is achieved simply by repeated removal of blood by regular weekly phlebotomy. The therapeutic removal of large volumes of blood permits a serial analysis of the variations of the relative proportions of lymphoid cell sets in the blood and their total numbers.

In the present paper we report the results of a study of the two major T lymphoid cell sets in patients with haemochromatosis followed up at regular intervals during therapy. Patients differed in their CD4 and CD8 lymphocyte counts and CD4/CD8 ratios at the start of therapy; individual values remained stable during the course of intensive phlebotomy therapy, which involves in some cases the removal of 10x the total blood volume. The observed stability of CD4/CD8 ratios confirms the existence of a homeostatic regulation of the relative numbers of the two major peripheral T cell pools in man. Furthermore this study reveals a novel correlation between CD4/CD8 ratios and rate of iron absorption in idiopathic haemochromatosis.