

TECHNIQUE GÉNÉRAL POUR L'EXTRACTION DU SYSTÈME PÉRIPHÉRIQUE TOTAL DE L'OVULE D'OURSIN.

par

Pierre Guerrier

Station biologique de Roscoff.

Résumé

En l'absence de calcium, on a pu récupérer l'ensemble du système membranaire périphérique encore porteur des granules corticaux chez cinq espèces d'Ourisins.

De nombreux faits expérimentaux ont souligné l'importance des couches corticales de l'œuf dans le contrôle des processus morphogénétiques (Raven, 1964; Pasteels, 1964; Guerrier, 1971). Dans l'état actuel de la question, il apparaît cependant que seul un développement rapide des techniques d'isolement adéquates devrait permettre de pousser l'analyse des interactions cortico-endoplasmiques ainsi appréhendées jusqu'au niveau moléculaire.

Dans le cas de l'œuf d'Ourisins, des études classiques (Endo, 1952, 1961; Afzelius, 1956; Motomura, 1960; Wolpert et Mercer, 1961) ont démontré l'existence d'un système membranaire périphérique relativement complexe. De l'extérieur vers l'intérieur, on rencontre successivement la membrane vitelline puis la membrane plasmique dont la face interne est au contact direct des granules corticaux. Ces derniers éléments éclatent lors de la fécondation et participent à la consolidation de la membrane vitelline qui s'élève et prend valeur de membrane de fécondation. La méthode que nous avons mise au point est basée sur le fait que les granules corticaux restent intacts en absence d'ions calcium (Endo, 1952; Kacser, 1955). Elle permet d'obtenir l'ensemble du système périphérique, tout en respectant des conditions d'osmolarité et de pH parfaitement physiologiques, ce qui constitue un progrès notable par rapport à la technique préconisée par Motomura (1954).

Technique

Des ovules à maturité, libérés après une injection péribucale de chlorure de potassium isotonique sont filtrés sur étamine puis lavés à l'eau de mer filtrée sur millipore. Centrifugés à faible vitesse et lavés

dans de l'eau de mer artificielle sans calcium ni magnésium, ils sont ensuite resuspendus et lavés par centrifugation dans une solution de chlorure de sodium isotonique réalisée dans un tampon Tris-maléate 0,05 M, pH 8,2 renfermant 0,001 M d'EDTA disodique. Le passage dans ces milieux débarrasse les œufs de leur gangue gélatineuse. Il importe alors de provoquer rapidement la rupture de l'enveloppe corticale par un traitement très doux, ce qui exclut l'usage des homogénéiseurs classiques. D'excellents résultats sont habituellement obtenus à l'aide d'une micropipette, branchée sur un fin tube de caoutchouc commandé par succion. C'est ainsi que nous n'avons eu aucune difficulté à préparer des enveloppes vides d'endoplasme à partir de l'œuf de cinq espèces d'Oursins de provenances très diverses : *Strongylocentrotus purpuratus* (Californie), *Arbacia punctulata* (Massachusetts), *Echinus esculentus*, *Paracentrotus lividus* et *Sphaerechinus granularis* (Roscoff), ce qui souligne le caractère très général de la méthode proposée.

Des quantités de matériel beaucoup plus importantes peuvent être obtenues par d'autres traitements mécaniques modérés tels qu'agitation, vibration, passage rapide dans une aiguille hypodermique, le choix entre ces divers procédés dépendant essentiellement de la solidité relative des systèmes périphériques concernés. Expérimenté dans le cas de *Strongylocentrotus purpuratus*, le traitement aux ultrasons reste cependant la méthode la plus efficace. Dans ces conditions, tous les œufs d'une même suspension se trouvent simultanément rompus en un point par lequel s'écoule rapidement tout l'endoplasme. Il est alors facile de récupérer les enveloppes cellulaires par centrifugation différentielle.

Observations

Sur la planche I (1 à 6), on notera que les enveloppes isolées entraînent une couche de particules cytoplasmiques. En l'absence des micrographies électroniques qui permettraient de régler définitivement la question, il semble cependant que ces particules puissent être assimilées, sans risque majeur, aux granules corticaux. Ainsi, on rencontre toujours quelques granules épars d'échinochrome dans les enveloppes d'*Arbacia* (Planche I, 4) tandis que les enveloppes de *Paracentrotus* présentent, de manière constante, le classique anneau cortical rouge. Par ailleurs, des enveloppes isolées de *Strongylocentrotus*, mises

PLANCHE 1

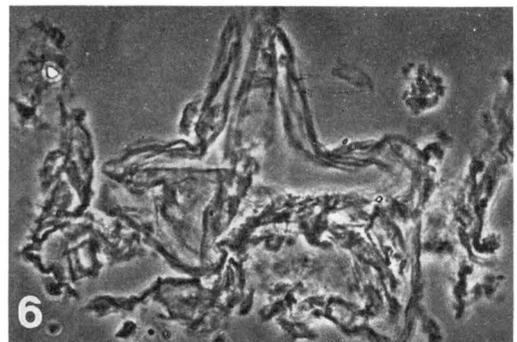
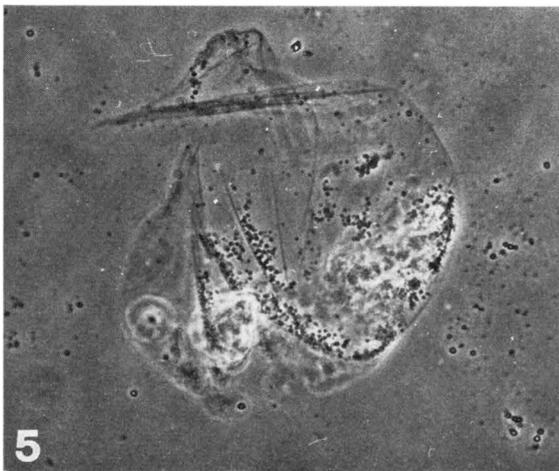
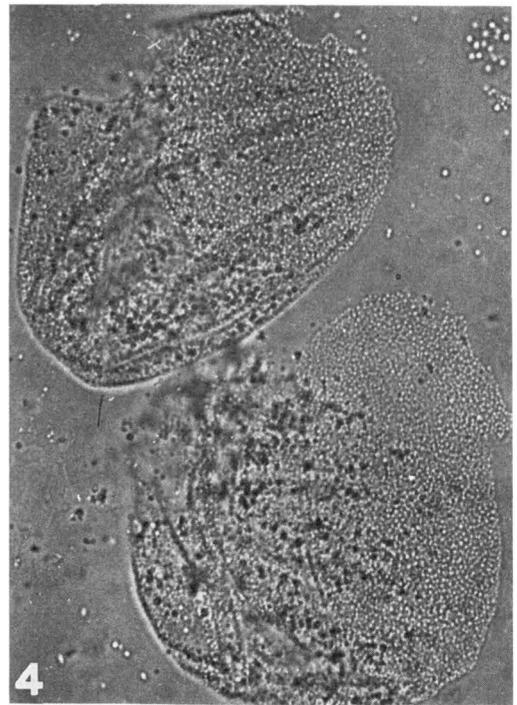
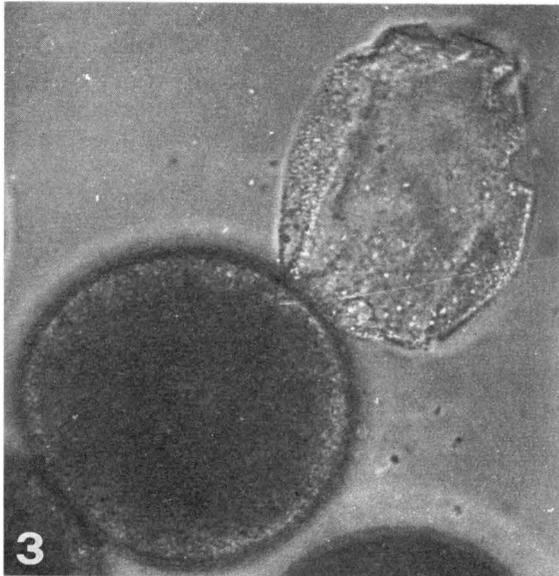
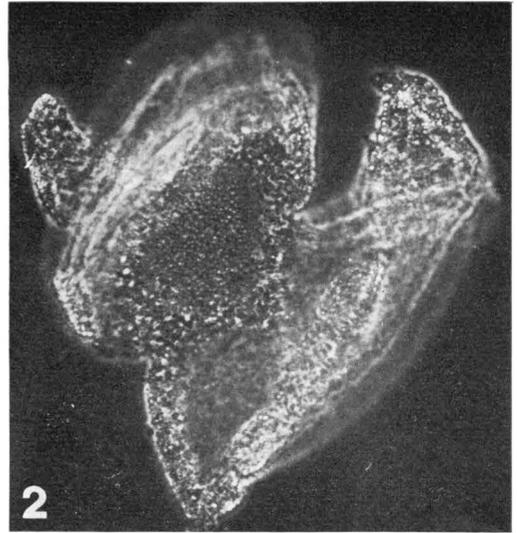
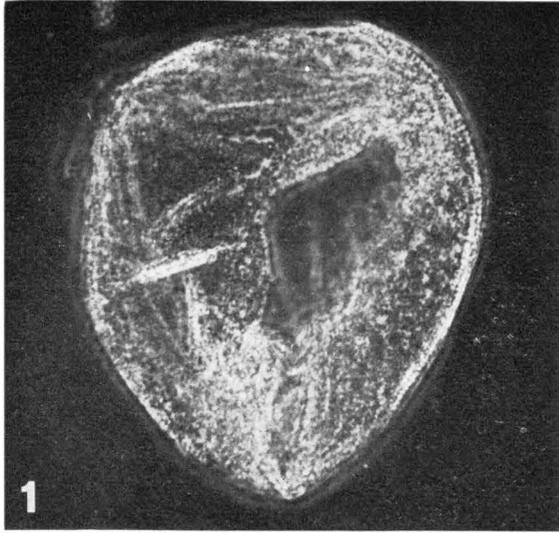
Systèmes périphériques isolés observés dans diverses conditions d'illumination : Contraste de phase à fond sombre (1, 2). Eclairage ordinaire (3, 4). Contraste de phase à fond clair (5, 6).

Strongylocentrotus purpuratus

1 : enveloppe vide d'endoplasme obtenue après 15 secondes de traitement par les ultrasons (puissance 30) ; 2 : préparation analogue éclatée après passage dans une micropipette.

Arbacia punctulata

3 : ovule à maturité et enveloppe isolée ; 4 : deux enveloppes obtenues par passage dans une seringue. Les granules d'échinochrome apparaissent plus sombres et plus volumineux que les granules corticaux ; 5 : enveloppe comprimée entre lame et lamelle. Le détachement des granules corticaux libère le système membranaire ; 6 : système membranaire récupéré après lyse des enveloppes dans un tampon bicarbonate de sodium 0,001M, pH 7,4 et lavage par centrifugation.



en présence d'eau de mer, libèrent spontanément les deux types de produits normalement fournis par les granules corticaux : bâtonnets cristallins cylindriques et protéine hyaline tels qu'ils ont été décrits par Endo (1952) et Bryan (1970). Parfois, elles peuvent même former une structure rigide analogue à la membrane de fécondation. Le fait que le traitement subi par les ovules intacts n'empêche pas la formation d'une membrane normale après fécondation plaide également en faveur de la présence de la membrane vitelline au sein des enveloppes isolées. En dernier ressort, on notera que les granules corticaux ne demeurent intacts que dans les conditions d'une osmolarité normale et qu'ils se lysent rapidement (Planche I, 6) par lavage dans une solution de bicarbonate de sodium 0,001 M, ajustée à pH 7, 4 par l'acide acétique. Il est donc clair que les membranes plasmiques, préparées par homogénéisation directe dans ce tampon et purifiées par lavages et centrifugations différentielles répétées (Inoue et al. 1971), sont exemptes de matériel cortical, ce qui est par ailleurs confirmé par l'examen des sections ultrafines réalisées sur les culots membranaires obtenus.

L'auteur tient à exprimer toute sa gratitude à Monsieur le Professeur G.H. Cousineau pour les facilités qu'il lui a accordées tant à l'Université de Montréal qu'au Marine biological Laboratory de Woods Hole. Ses remerciements les plus sincères vont également à la direction et au personnel des Stations de Roscoff et de Woods Hole.

Summary

A technique is presented which allows the recuperation of the overall peripheral membrane system with cortical granules in five sea-urchin species.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- AFZELIUS, B.A., 1956. — The ultrastructure of the cortical granules and their products in the sea urchin egg as studied with the electron microscope. *Exp. Cell. Res.*, 10, pp. 257-285.
- BRYAN, J., 1970. — The isolation of a major structural element of the sea urchin fertilization membrane. *J. Cell. Biol.*, 44, pp. 635-644.
- ENDO, Y., 1952. — The role of the cortical granules in the formation of the fertilization membrane in eggs from Japanese sea urchins. *Exp. Cell. Res.*, 3, pp. 406-418.
- ENDO, Y., 1961. — Changes in the cortical layer of sea urchin eggs, at fertilization as studied with the electron microscope. *Exp. Cell. Res.*, 25, pp. 383-397.
- GUERRIER, P., 1971. — La polarisation cellulaire et les caractères de la segmentation au cours de la morphogenèse spirale. *Ann. Biol.*, 10, pp. 151-192.
- INOUE, S., PREDDIE, E.C. et GUERRIER, P., 1971. — Isolated plasma membranes of sea urchin eggs. 29th Ann. E.M.S.A. Meeting, pp. 534-535.
- KACSER, H., 1955. — The cortical changes on fertilization of the sea-urchin eggs. *J. exp. Biol.*, 32, pp. 451-467.
- MOTOMURA, I., 1954. — On a method of isolation of the egg cortex in the sea urchin egg. *Sc. Rep. Tôhoku Univ.* (4), *Biology*, 20, pp. 318-321.
- MOTOMURA, I., 1960. — On the structure of the cortical granule in the sea urchin eggs. *Sci. Rep. Tôhoku Univ.* (4), *Biology* 26, pp. 267-374.
- PASTEELS, J.J., 1964. — The morphogenetic role of the cortex of the Amphibian egg. *Advances in Morphogenesis*, 3, pp. 363-388.
- RAVEN, C.P., 1964. — Mechanism of determination in the development of Gastropods. *Advances in Morphogenesis*, 3, pp. 1-32.
- WOLPERT, L. et MERCER, E.H., 1961. — An electron microscope study of fertilization of the sea-urchin eggs *Psammechinus miliaris*. *Exp. Cell Res.*, 22, pp. 45-55.