

## VARIATIONS DE LA TENEUR EN ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE DU NOYAU EN FONCTION DE L'ACTIVITÉ CELLULAIRE

J. FAUTREZ

Laboratoire d'Anatomie, Université de Gand

**Abstract**—Since the researches of BOIVIN, VENDRELY and VENDRELY, it is well known that the interphase nucleus is much richer in DNA than was thought in classical histology. The average content of DNA of nuclei of various tissues from individuals of the same species is relatively constant and is a function of the number of chromosomes. However, it must, be noted that since the start of these researches the abstract need for constancy of the DNA content of the nuclei strongly affected the opinions of many observers. Without wishing to deny that there exists an incontestable tendency towards a relative constancy of DNA the writer presents a series of results obtained in his laboratory by the histophotometric method of LISON. These experiments show that there exists a variation in the mean DNA content of the nuclei which is related to the cellular activity. Emphasis is especially placed on the observed variations at the level of endocrine glands; thyroid, adrenal (cortex and medulla) and ovary. Remembering that an increase in DNA content corresponds to an activation of the gland, we reach in each case a logical interpretation. Known facts of endocrine histophysiology supply many points of confirmation. It is certain that the histophotometric estimation of the DNA provides a true picture of the state of endocrine activity at cellular level.

DEPUIS les travaux initiaux de BOIVIN *et al.* (1948), de nombreuses études biochimiques et histophotométriques ont été consacrées à la teneur en acide désoxyribonucléique (ADN) du noyau. Elles ont montré que le noyau interphasique est bien plus riche en ADN que ne l'enseignait l'histologie classique. La teneur moyenne en ADN des noyaux des divers tissus d'individus d'une espèce donnée est relativement constante en fonction du nombre de chromosomes. C'est ainsi que les cellules diploïdes contiennent deux fois plus d'ADN que les gamètes haploïdes. Dans les tissus qui présentent des classes nucléaires à degrés de polyploidie croissants, la teneur moyenne des noyaux qui tombent dans ces diverses classes, croît également selon une progression géométrique à raison 2.

Il faut cependant faire remarquer que la nécessité d'une constance absolue de la teneur en ADN imprègne fortement l'esprit de bon nombre de chercheurs. Cette attitude trouve son origine dans l'hypothèse hardie de BOIVIN et VENDRELY, qui, reconnaissant dans l'ADN un corps quantitativement constant localisé dans le noyau, l'assimilent aux gènes en se basant sur la considération que le mécanisme génétique est stable par définition. Cette position de principe, prise dès le début de la recherche avec un faisceau d'informations minime, repose indubitablement sur deux postulats. Il est admis, par une généralisation hâtive, que la teneur en ADN des noyaux est rigoureusement constante et non influençable par une série de

conditions physiologiques. Mais de plus il est postulé que la constance génétique implique une constance quantitative. Or si la constance génétique ne se comprend sans doute pas sans constance qualitative d'un substrat matériel, on ne voit nullement pourquoi elle sous-entend nécessairement une constance quantitative de celui-ci.

Quoiqu'il en soit, cette hypothèse est devenue une véritable idée préconçue. De nombreux chercheurs en arrivent à rejeter comme atteint de causes d'erreurs multiples et variées tout résultat qui s'éloigne de la constance quantitative, tandis qu'ils admettent sans le moindre examen critique tout ce qui la corrobore. D'autres (VILLA, 1955) vont encore bien plus loin; pour eux la teneur en ADN n'est pas seulement constante dans des cellules normales, mais il est admis *a priori* que des conditions pathologiques diverses ne peuvent l'atteindre. Ainsi par exemple dans des foies intoxiqués expérimentalement, la teneur en ADN, considérée sans plus comme invariable, est utilisée comme standard pour l'appréciation de la variation d'autres constituants chimiques du tissu lésé.

Sans vouloir nier, qu'au moins dans les tissus adultes et qui ne sont pas engagés dans une activité anabolique ou proliférative intense, il existe une tendance incontestable à une constance relative de l'ADN, nous nous proposons de présenter ici quelques travaux récents—certains encore inédits—de notre laboratoire qui ont permis de déceler par la technique histophotométrique de LISON (1950) des variations, parfois importantes, de la teneur en ADN en relation avec l'activité cellulaire. Nous devons forcément nous limiter à quelques exemples; les résultats obtenus dans notre laboratoire ne sont pourtant pas les seuls à plaider en faveur des variations de la teneur en ADN. Au moment où LOWE *et al.* (1959) viennent de montrer que des variations relevées par histophotométrie ne sont pas l'effet de l'imprécision de la méthode, puisqu'ils retrouvent dans les mêmes conditions des variations de même ordre et par histophotométrie et par dosage chimique, on ne peut qu'être étonné, que même dans leurs publications les plus récentes certains tenants de la "constance absolue en ADN" en semblent tout simplement ignorer l'existence (VENDRELY et VENDRELY, 1957; ALFERT, 1957).

Prenons un histogramme (Fig. 1) qui résume les résultats d'une série de mesures histophotométriques et dans lequel les teneurs relatives en ADN sont portées selon une échelle logarithmique sur l'axe des abscisses, tandis qu'en ordonnées sont indiqués les nombres de noyaux dans lesquels cette teneur vient se ranger entre deux valeurs successives placées sur l'axe horizontal. On voit immédiatement que ces teneurs de noyaux individuels se rangent dans chaque tissu, ou dans chaque classe nucléaire lorsque le tissu examiné en comporte plusieurs, autour d'une valeur moyenne, mais que les écarts entre les valeurs extrêmes sont importants et vont chaque fois à peu près du simple au double. Il existe une série d'arguments pour admettre que ces variations mesurées ne sont pas essentiellement dues à des erreurs de mesure, mais qu'elles correspondent surtout à des variations réelles. Ces variations, qui échappent évidemment au dosage chimique, montrent par elles seules déjà, qu'il est abusif de parler d'une constance absolue de l'ADN dans le noyau. La moyenne que l'on établit n'a au contraire que la valeur d'une constante biologique qui représente comme la plupart de celles-ci, un état d'équilibre autour duquel oscillent les diverses valeurs individuelles.

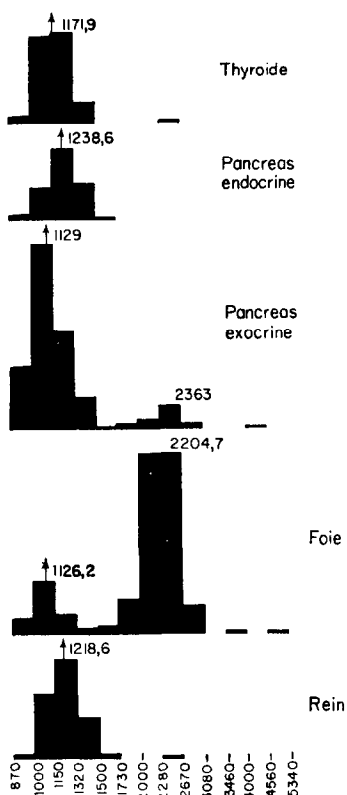


FIG. 1

Remarquons incidemment que les teneurs individuelles ne présentent pas une distribution normale autour de cette moyenne. C'est ce que notre collaborateur ROELS (communication personnelle) a pu montrer pour les différentes couches de la cortico-surrénale du rat blanc par les tests de symétrie et de curtose. Des simples diagrammes de probabilité appliqués au même matériel et à une série d'autres tissus ont au contraire montré que cette distribution est log-normale. Cette constatation nous a dès lors conduit à abandonner les analyses statistiques par la méthode à paramètres sur les chiffres naturels pour les appliquer aux logarithmes des valeurs obtenues expérimentalement.

Si nous considérons maintenant les teneurs moyennes en ADN des noyaux d'un tissu donné chez divers individus d'une même espèce, nous verrons qu'elles présentent à leur tour des oscillations individuelles non négligeables. Si ces moyennes individuelles résultent d'un nombre suffisant de mesures (50 ou 100 par classe cellulaire), les oscillations sont réelles, mais ne dépassent guère les 15 pour cent pour des animaux sains et normaux en dehors de toute intervention expérimentale. Elles sont cependant suffisamment importantes pour cacher des modifications de la teneur moyenne en ADN en fonction de l'activité cellulaire, qui, le plus souvent, seront du même ordre de grandeur.

Il ne serait cependant pas difficile de prouver statistiquement, comme le fit ROELS (1956) pour un groupe de thyroïdes de rat, que les noyaux du même organe

de différents individus d'une même espèce appartiennent, quant à leur teneur en ADN, à une population homogène. On est dès lors autorisé à déterminer une moyenne générale sur le *pool* des mesures sur divers individus. On obtiendra ainsi une nouvelle constante statistique caractéristique pour un organe chez des animaux normaux d'une espèce donnée. L'expérience nous a montré qu'elle est stable et reproductible lorsqu'on la calcule à partir de mesures effectuées sur cinq animaux. C'est cette constatation qui nous a mené à imposer dans notre laboratoire la technique standard suivante pour l'étude de l'influence de certaines conditions expérimentales sur la teneur en ADN des noyaux. Les organes étudiés de cinq animaux témoins sont "techniqués" simultanément avec ceux de cinq animaux soumis à l'expérience. Dans chaque organe cinquante mesures par classe nucléaire sont effectuées à l'appareil et selon la technique de LISON. On compare par l'analyse statistique les moyennes de deux *pools*, groupant l'un l'ensemble de mesures effectuées sur les cinq témoins, l'autre celui des mesures effectuées sur les cinq animaux traités. Cette manière de faire exclut les variations individuelles, qui sinon viendraient bien souvent fausser les résultats.

Comme garantie supplémentaire et surtout afin de rendre comparables des résultats fournis par diverses expériences successives, nous déterminons en outre une valeur de référence pour toutes ces teneurs exprimées en unités arbitraires. Cette valeur appelée "diploïde théorique" n'est autre chose que la moitié de la teneur moyenne en ADN des noyaux de cinquante spermatocytes I mesurés dans un testicule de même espèce et "techniqué" ensemble avec les organes à étudier.

Cette technique nous a permis de montrer avec deux jeunes chercheurs de Bologne, PISI et CAVALLI (1955) que l'hypertrophie compensatrice du rein du rat s'accompagne d'une augmentation significative de la teneur moyenne en ADN des noyaux intercinétiques. Cette augmentation n'est pas en relation directe et simple avec l'accroissement de l'activité mitotique, puisqu'elle ne se retrouve pas lorsque cette dernière est élevée par hydronéphrose débutante ou sous l'effet de la thyroxine (FAUTREZ et ROELS, 1954; PISI et CAVALLI, 1955).

C'est ainsi aussi qu'avec PISI et CAVALLI (1955) nous avons montré qu'une augmentation notable de la teneur en ADN accompagne et suit l'onde mitotique provoquée dans le foie du rat blanc par le traitement au thiouracil.

Un autre collaborateur temporaire, LAQUERRIÈRE (1958) de Rouen, montra que l'hypertrophie compensatrice du foie de cobaye, lequel ne comporte qu'une seule classe nucléaire (DASKALIDES, 1956), est accompagnée d'une élévation de 20% de la teneur moyenne en ADN. Chez la souris les conditions sont plus complexes; on semble bien assister à une transformation de toutes les cellules  $2n$  en cellules  $4n$ .

Mais c'est surtout sur le cas des organes endocrines que je voudrais attirer votre attention aujourd'hui.

Après avoir montré que chez le rat blanc la teneur moyenne en ADN des noyaux de la thyroïde est stable et se situe à peu près à 15% au-dessous de la valeur diploïde théorique, ROELS (1956) a stimulé l'activité physiologique de la glande par des agents divers: propylthiouracil, froid, croissance (jeunes rats âgés de 1 mois). Dans les divers cas les noyaux réagissent dans le même sens par une augmentation de la teneur moyenne en ADN, qui se rapproche de la valeur diploïde théorique. Après mise au repos de la glande (thyroxine, lugol, hypo-

physectomie) au contraire, la teneur moyenne en ADN présente une chute notable. Il y a donc une relation directe entre l'activité métabolique de la cellule thyroïdienne et la teneur en ADN de son noyau. La modification de l'activité cellulaire a par ailleurs été vérifiée par le test histologique mis au point par GOORMAGHTIGH et THOMAS (1934).

Des résultats superposables furent obtenus tout récemment par un de nos élèves, LEEMAN (1959) sur la médullo-surrénale. Ils sont résumés dans le Tableau 1.

TABLEAU 1

	$n$	$\bar{x}$	$\log \bar{x}$	$S$	$S \log \bar{x}$
Spermatocytes I	50	2445	3,388	0,038	0,005
	Valeur diploïde théorique (2S):1222,5				
Témoins	250	1165	3,065	0,050	0,003
Splanchnicectomie	250	800	2,903	0,085	0,005
Témoins	250	1145	3,057	0,054	0,003
Insuline	250	1303	3,114	0,045	0,009

On y remarquera que la mise au repos de l'organe par splanchnicectomie bilatérale produit une chute de 31,1% de la teneur moyenne en ADN des noyaux. La stimulation par l'insuline par contre est suivie d'une élévation de ce taux qui atteint 12,8%.

Des expériences plus récentes montrent que la stimulation par le froid produit une élévation d'ADN du même ordre dans la médullo-surrénale.

Thyroïde et médullo-surrénale sont, d'un point de vue histophysiologique, des organes assez homogènes. Il nous a semblé que le dosage de l'ADN pourrait être utile dans l'étude de l'histophysiologie d'organes plus complexes, tels que la cortico-surrénale ou l'ovaire.

En ce qui concerne la fonction des diverses couches du cortex surrénalien, l'accord est en effet loin d'être réalisé entre les divers auteurs. Une théorie d'activité zonale s'oppose à la *lift-theory* de CHESTER-JONES. Cette contradiction s'explique avant tout par l'absence d'un test d'activité valable au niveau cellulaire. C'est ainsi que la sidérophilie (*dark cells*) est pour d'aucuns la signature d'une activité cellulaire intense, alors que pour d'autres elle serait simplement le fait de cellules jeunes. Tous ceux qui se sont occupés de la cortico-surrénale seront d'accord avec JOFFEY (1955) pour constater combien l'étude des graisses avec leurs variations tant qualitatives que quantitatives peut être décevante et fallacieuse.

ROELS (1956) a pu montrer que la teneur moyenne en ADN dans les noyaux de la cortico-surrénale du rat blanc mâle, quoique partout de l'ordre de la valeur diploïde théorique, n'est pas la même dans les diverses couches. Il existe au contraire un gradient décroissant de la surface vers la profondeur; les taux moyens dans la glomérulée et dans la fasciculée externe sont égaux et régulièrement plus élevés que ceux que l'on relève dans la fasciculée interne et dans la réticulée. Cette différence est de l'ordre de 15%.

Le Tableau 2 illustre les premiers résultats obtenus par l'injection répétée d'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et de cortisone (ROELS, 1956).

Dans les premiers travaux, la fasciculée interne ne fut pas considérée. De nouveaux résultats, encore inédits, viennent les compléter. Ils peuvent être résumés comme suit.

TABLEAU 2

Zone	Témoins				ACTH				Hydrocortisone			
	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	$S$	$n$	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	$S$	$n$	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	$S$	$n$
Glom.	809	$\pm 3$	58	465	823	$\pm 6$	143	490	790	$\pm 5$	117	478
Fasc.	769	$\pm 5$	110	493	768	$\pm 6$	128	499	692	$\pm 4$	106	493
Rétic.	705	$\pm 5$	111	486	756	$\pm 5$	112	492	695	$\pm 5$	116	474

L'injection répétée d'ACTH n'influence pas la teneur en ADN dans glomérulée et fasciculée. Par contre, on constate une augmentation de ce taux dans les couches profondes. Cette augmentation est progressive en ce sens, qu'on la met en évidence dans la fasciculée interne déjà après 4 jours d'expérience, alors qu'elle n'apparaît que plus tard dans la réticulée (15 jours). Sous l'effet de la cortisone et de l'hydrocortisone on ne constate qu'une diminution de la teneur en ADN dans la fasciculée externe. Il semble donc bien que fasciculée et réticulée forment un organe qui produit les glyco-corticoïdes, et dont l'activité est contrôlée par l'ACTH. La partie active en serait la fasciculée externe; les couches plus profondes seraient une zone de réserve. La couche active serait progressivement élargie sous l'effet de l'ACTH exogène. L'administration de cortisone ou d'hydrocortisone déprimerait au contraire le fonctionnement de la zone active.

Des injections répétées d'acétate de désoxycorticortérone (DOCA) produisent une diminution de la teneur en ADN au niveau de la glomérulée et de la fasciculée externe. La surcharge en chlorure de sodium produit un effet analogue, mais strictement localisé à la glomérulée. Il y a donc là une indication, que la glomérulée serait intéressée à la synthèse des minéralocorticoïdes. Il y aurait en effet à ce niveau une dépression élective de l'activité par la surcharge en sel. L'influence élargie à la fasciculée externe de la DOCA pourrait être la conséquence de "l'effet corticoïde" bien connu de cette préparation.

Ces résultats confirment et précisent les travaux de nature biochimique de GIROUD *et al.* (1958). Ils devront être contrôlés par des expériences similaires sur des animaux hypophysectomisés. Notons dès maintenant que l'hypophysectomie produit une chute significative du taux d'ADN dans toutes les couches du cortex surrénalien, sauf dans la glomérulée. Dans les autres couches, le gradient de la surface vers la profondeur reste cependant conservé à un niveau plus bas.

Pour ce qui est de l'influence d'hormones sexuelles, les résultats obtenus par ROELS peuvent être brièvement résumés comme suit. La testostérone et la lutéostimuline (LH) produisent une chute élective du taux d'ADN dans la fasciculée externe. Il s'agit d'une dépression de l'ACTH, déjà démontrée dans ces conditions par GOMPertz (1958). La castration, suivie ou non d'injection de LH, n'a aucune

action sur la teneur en ADN, quoique le cortex surrénalien soit régulièrement hypertrophié; il y a ici indication de décalage entre l'activité globale de l'organe et l'activité cellulaire. L'oestrone produit à côté de l'hypertrophie de l'organe une augmentation de la teneur moyenne en ADN au niveau de la fasciculée interne et de la réticulée. On pouvait s'attendre dans ces conditions à une influence non balancée d'ACTH, puisque l'oestrone en excès déprime la synthèse de corticostérone.

L'étude de la teneur en ADN des divers éléments de l'ovaire de lapin et de rat fut entreprise dans notre laboratoire par VAN DE KERCKHOVE (1959). Les premiers résultats de cette étude sont plus qu'encourageants. C'est ainsi qu'il fut démontré dans l'ovaire de lapin que la teneur moyenne en ADN des noyaux de la glande interstitielle varie fortement avec l'état fonctionnel, et qu'encore une fois elle augmente après stimulation (par le facteur LH) et qu'elle diminue fortement par la dépression (par la progestérone).

TABLEAU 3. OVAIRE DE LAPIN: CELLULES INTERSTITIELLES

	$\bar{x}_g$	$\log \bar{x}$	$S$	$S \log \bar{x}$	$n$	$t$	$P$
Témoins	1000	3,0000	0,0543	0,0033	277		
L.H.	1164	3,0661	0,0517	0,0030	261	14,536	<0,001
Témoins	1000	3,0000	0,0412	0,0082	249		
Progestérone	778	2,8912	0,0749	0,0055	200	9,064	<0,001

Chez le rat, VAN DE KERCKHOVE (1959) a étudié la teneur en ADN des noyaux des cellules de la granulosa d'une part, et du corps jaune issu de l'ovulation spontanée d'autre part. Il est connu que, chez le rat, ce dernier n'a pas d'activité endocrine. Déjà sur l'animal témoin, on constate que la teneur moyenne en ADN de la granulosa se trouve au-dessus de la valeur diploïde théorique, tandis que celle des cellules lutéales se situe loin en-dessous de celle-ci. Après hypophysectomie la teneur en ADN des cellules lutéales ne bouge pratiquement pas, tandis que l'on assiste à une chute importante de la teneur en ADN dans la granulosa. Des animaux hypophysectomisés furent traités à la gonadotrophine sérique (folliculostimuline (FSH) avec une certaine quantité de LH) et à la gonadotrophine chorionique (LH pratiquement pure). Les deux préparations produisent une élévation atteignant, respectivement, 41,3% et 31,9% de la teneur en ADN dans la granulosa. En ce qui concerne les cellules lutéales une augmentation de 13,8% est produite par la gonadotrophine chorionique. La gonadotrophine sérique produit une augmentation plus légère mais encore réelle (8,3%): elle est peut-être due au facteur LH que l'on trouve dans ce produit. Le Tableau 4 concrétise ces résultats.

Dans ces expériences, et dans d'autres actuellement en cours, on est frappé de voir qu'il est possible d'obtenir dans l'ovaire des variations de la teneur en ADN dont l'amplitude dépasse largement ce que l'on trouve pour d'autres organes. Il n'est pas interdit de mettre cette constatation en rapport avec le fait que l'on a

affaire à un organe dont l'activité varie, dans les conditions physiologiques, très fortement d'un moment à l'autre.

De l'ensemble des expériences que nous venons de relater nous pouvons conclure que la teneur moyenne en ADN des noyaux d'un tissu ou d'un organe peut varier de manière notable avec l'activité physiologique. Il est plus en particulier permis de croire que les dosages de l'ADN nucléaire fourniront un nouveau test d'activité cellulaire applicable à l'étude des glandes à sécrétion interne et des interactions endocrines au niveau cellulaire.

TABLEAU 4

	<i>n</i>	$\bar{x}$	$\log \bar{x}$	<i>S</i>	<i>S log <math>\bar{x}</math></i>
Spermatocytes I	101	2349 2S-1175	3,37099712	0,052	0,0158
		<i>Cellules de la granulosa</i>			
Témoins	286	1310	3,11725434	0,109	0,0064
Hypophysectomie	203	1079	3,03184541	0,088	0,0062
Hypophys. + gonad. sérique	199	1552	3,19071553	0,112	0,0079
Hypophys. + gonad. chorion.	152	1423	3,15339293	0,085	0,0069
		<i>Cellules lutéales</i>			
Témoins	499	986	2,96825309	0,084	0,0093
Hypophysectomie	146	950	2,97886604	0,076	0,0063
Hypophys. + gonad. sérique	200	1029	3,01264326	0,089	0,0063
Hypophys. + gonad. chorion.	153	1124	3,05071273	0,083	0,0067

## RÉSUMÉ

Depuis les travaux de BOIVIN, VENDRELY et VENDRELY, il est connu que le noyau interphasique est bien plus riche en ADN que ne l'enseignait l'histologie classique. La teneur moyenne en ADN des noyaux de divers tissus d'individus d'une même espèce est relativement constante et fonction du nombre de chromosomes. Il faut cependant faire remarquer que depuis le début des recherches la nécessité d'une constance absolue de la teneur en ADN des noyaux impregne fortement l'esprit de bon nombre de chercheurs. Sans vouloir nier qu'il existe une tendance incontestable à une constance relative d'ADN, l'auteur présente une série de résultats obtenus dans son laboratoire par la technique histophotométrique de L. LISON, qui démontrent des variations de la teneur moyenne en ADN des noyaux en fonction de l'activité cellulaire. L'accent est surtout mis sur des variations observées au niveau de glandes endocrines: thyroïde, cortico-surrénale, médullo-surrénale et ovaire. En considérant que l'augmentation de la teneur en ADN correspond à une activation, la diminution de cette teneur à une mise au repos de la glande, on arrive dans chaque cas à des interprétations logiques, qui trouvent de nombreux points d'appui dans des faits connus d'histophysiologie endocrinienne. Il est incontestable que le dosage histophotométrique d'ADN fournit un test fidèle de l'activité endocrine au niveau cellulaire.



## BIBLIOGRAPHIE

- ALFERT M. (1957). *Arch. Klaus-Stift. Vererb. Forsch.* **32**, 553.
- BOIVIN A., VENDRELY R. et VENDRELY C. (1948). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **226**, 1061.
- CHESTER-JONES J. (1957). *The Adrenal Cortex*. Cambridge University Press.
- DASKALIDES J. (1956). *C.R. Soc. Biol., Paris* **150**, 1008.
- FAUTREZ J., PISI E. et CAVALLI G. (1955). *Exp. Cell Res.* **9**, 189.
- FAUTREZ J. et ROELS H. (1954) *Arch. Biol.*, **65**, 459.
- GIROUD C., STACHENKO J. et PILETTA P. (1958). In vitro studies of the functional zonation of the adrenal cortex and of the production of aldosterone. Dans *An International Symposium on Aldosterone* pp. 56-72. J. and A. Churchill, London.
- GOMPERTZ D. (1958). *J. Endocrin.* **17**, 107.
- GOORMAGHTIGH N. et THOMAS F. (1934) *Amer. J. Path.* **10**, 713
- JOFFEY J. M. (1955). Some observations on the problem of cortical zoning. Dans *Ciba Foundation Symposium on Endocrinology VIII*. (Publié par WOLSTENHOLME E. W.) pp. 18-30. London.
- LAQUERRIÈRE R. (1958). *Arch. Biol.*, **69**, 467.
- LEEMAN H. (1959) *Exp. Cell Res.* **16**, 686.
- LEEMAN H. (1959) *Nature, Lond.* **183**, 1188
- LISON L. (1950) *Acta Anat.* **10**, 333.
- LOWE C. U., BOX H., VENKATARAMAN P. R. et SARKARIA D. S. (1959) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 251.
- PISI E. et CAVALLI G. (1955) *Arch. Biol.*, **66**, 439.
- ROELS H. (1956) *Arch. Biol.*, **67**, 211.
- ROELS H. (1956) *C.R. Soc. Biol.*, **150**, 2273.
- VAN DE KERCKHOVE D. (1959) *C.R. Ass. Anat.* Sous presse.
- VENDRELY R. et VENDRELY C. (1957). *L'Acide Désoxyribonucléique, Substance Fondamentale de la Cellule Vivante*. A. Legrand, Paris.
- VILLA L. (1955). Dans *Atti dei Congressi della Società italiana di Medicina interna*, 56° Congresso 2<sup>a</sup> Relazione: *La insufficienza epatica*. L. Pozzi, Roma.

## DISCUSSION

R. VENDRELY:

(1) Je profite de l'occasion qui m'est offerte pour demander à Professeur FAUTREZ de nous aider à élucider une question qui est pour nous un mystère; à savoir: Qui a introduit pour la première fois l'idée d'une constance absolue pour l'ADN. En tous les cas, je peux dire que ni M. BOIVIN, ni Mme. VENDRELY, ni moi-même, n'avons jamais considéré d'une quelconque façon le noyau comme un "coffre-fort" hermétique.

(2) Nous avons beaucoup de respect et d'estime pour les méthodes cytochimiques à l'étalement desquelles nous avons contribué (d'une part au laboratoire du Professeur LEUCHTENBERGER à Cleveland, U.S.A.—d'autre part au laboratoire du Professeur CASPERSSON à Stockholm), mais nous voudrions attirer l'attention sur le danger qu'il y aurait à considérer les résultats fournis par ces méthodes avec une trop absolue rigueur. On connaît bien actuellement la méthode de Feulgen et ses qualités, mais on ne peut être encore absolument certain que l'intensité des colorations fournies par cette technique n'est pas influencée, dans un sens ou dans l'autre; par la présence, dans le cytoplasme (cas des études sur coupes) ou dans le noyau cellulaire, de substances issues du métabolisme normal ou perturbé: protéines, lipides complexes, polysaccharides. Nous pensons que Professeur FAUTREZ et ses collaborateurs auraient peut-être intérêt à isoler pour les analyser les noyaux de

chacune des couches tissulaires qu'ils étudient dans certains cas. Ils se mettraient ainsi, au moins partiellement, à l'abri de cette critique.

J. FAUTREZ: S'il est vrai que ni M. BOIVIN, ni Mme. VENDRELY, ni M. VENDRELY n'ont avancé la notion de la constance absolue de l'ADN, il faut bien constater que leurs résultats ont été interprétés dans ce sens par toute une série d'auteurs, qui sous l'influence de leur hypothèse génétique ont repris cette notion de constance absolue, parfois d'une manière nuancée, mais très souvent de manière intransigeante (cf. les travaux d'ALFERT). Je suis très heureux d'entendre dire par M. VENDRELY que le noyau n'est pas un "coffre-fort" hermétique, ce qui rapproche évidemment très fort nos points de vue.

Je crois pour ma part que les chiffres obtenus à l'appareil de LISON dans une série de laboratoires comme dans le nôtre forment dès maintenant un tout cohérent; dans des organes très divers et dans des conditions variées, on obtient des variations des teneurs moyennes d'ADN exprimées en valeurs relatives, qui peuvent trouver une explication logique, si l'on admet que l'augmentation de l'activité cellulaire peut aller de pair avec une augmentation en ADN, sa mise au repos avec une diminution en ADN.

Je suis convaincu que, si l'on oubliait pour un instant que les chiffres obtenus ont quelque relation avec la teneur en ADN, personne ne contesterait cette relation entre de quelconques "unités Lison" et le degré d'activité cellulaire. Mais comme il s'agit de mesures de teneur en ADN, ces variations sont pour d'aucuns *a priori* suspectes voire impossibles.

Il est indéniable que la technique histophotométrique reste jusqu'à un certain point une technique empirique, dont les résultats doivent être interprétés de manière critique. Les conditions des mesures sont très différentes de celles de la spectrophotométrie des biochimistes. Il n'en est pas moins vrai, qu'une série d'objections théoriques d'ailleurs théoriquement difficiles à réfuter, se sont montrées à la pratique pour le moins fortement exagérées. Si ces objections étaient fondées, elles nous obligeraient d'ailleurs à rejeter tout simplement la technique, qui, dans ces conditions, ne prouverait pas plus la constance de la teneur en ADN que ses variations.

Dans nos conditions expérimentales, qui par les *pools* de mesures effectuées dans différents individus tendent à exclure des variations individuelles, des variations de plus de 4 à 5% se sont toujours montrées reproductibles dans le même sens.

Il a été montré que les mesures des teneurs en ADN dans un même tissu, étaient identiques lorsqu'elles étaient effectuées *in situ*, sur noyaux isolés et même sur noyaux isolés et rendus plus homogènes.

En isolant les noyaux, on perd évidemment une partie des avantages des dosages *in situ*. ROELS a d'ailleurs pu montrer que des fortes variations de la quantité de lipides cytoplasmiques n'interfèrent guère en histophotométrie de l'ADN du noyau de la cellule surrénalienne: la même teneur en ADN se retrouve dans la fasciculée externe des témoins et d'animaux traités aux oestrogènes et dont la fasciculée externe a perdu la majeure partie de ses inclusions lipidiques.

Mme FICQ: Un argument en faveur d'une certaine variabilité de quantité d'ADN dans le noyau vient des observations autoradiographiques que nous avons faites sur les chromosomes individuels des glandes salivaires de *Rhynchosciara*.

Au cours du développement de la larve, dans certaines bandes, le taux d'incorporation de la thymidine dans l'ADN peut être élevé de 50 à 100 fois dans l'intervalle de 3 à 6 jours. Des mesures microspectrophotométriques faites à Philadelphie par RUDKIN accusent une augmentation de la teneur en ADN de 200% dans ces mêmes bandes. (Il peut s'agir d'un "ADN métabolique".) Ces variations, incontestablement significatives à l'échelle de la bande chromosomiale, ne correspondent cependant qu'à environ 10% dans le noyau total, c'est-à-dire sont de l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales.

H. ROELS: Malgré une différence de concentration de la masse anhydre du noyau au niveau de la zone glomérulaire et fasciculée externe, nous retrouvons une même teneur en ADN dans les noyaux de ces deux couches. Ceci indique que l'effet protéinique ne peut expliquer les différences trouvées.

G. MAYER: Je voudrais insister sur l'intérêt que présente la méthode de M. FAUTREZ pour l'endocrinologue. Les résultats qu'il nous a apportés cadrent avec les données de Deane et Greep sur la zonation dans la cortico-surrénale (la castration chez la souris ne provoque-t-elle pas après l'apparition de la zone X, une variation d'ADN à ce niveau? D'autre part, cette technique permettra probablement de définir avec plus de précision des variations d'activité des corps jaunes, en particulier chez la ratte qui présente quatre types de corps jaunes dont l'activité sécrétoire semble différente.

E. BAECKELAND: Quelle peut être, dans vos conditions d'expérience, l'importance de l'erreur éventuelle que l'on commet quand, lors d'un dosage cytophotométrique, le champ de référence est pris dans des cytoplasmes de structure différente? Je signalerai que nous-même avons dû prendre un champ de référence extracytoplasmique au cours de nos expériences sur la DNase neutre; en effet, dans ce cas le chondriome modifié en "boules" mais non Feulgen-positif présentait une absorption lumineuse non spécifique qui n'était pas négligeable.

J. FAUTREZ: Je ne crois pas que la cause d'erreur par mesure du blanc dans le cytoplasme ait une influence considérable: dans le cas de la surrénale, le cytoplasme est dense au niveau de la glomérulaire et dilué au niveau de la fasciculée. Nous retrouvons néanmoins dans ces deux couches une teneur en ADN égale.

W. PLAUT: Have you examined your experimental animals after recovery from drug action? Do the modifications remain?

J. FAUTREZ: Jusqu'à ce jour nous n'avons examiné les animaux qu'immédiatement à la fin des expériences. Il serait sans doute intéressant de poursuivre l'évolution ultérieure de la teneur en ADN des noyaux.

D. VAN DE KERCKHOVE: En ce qui concerne les variations observées dans l'ovaire, je tiens cependant à faire remarquer que les chiffres projetés se rapportent à une expérience d'une durée de 5 jours. Les mêmes variations, plus prononcées encore dans certains cas, ont été observées dans un autre groupe d'expériences où la durée de l'expérience était de 15 jours.

R. VENDRELY propose de contrôler les résultats décrits par M. FAUTREZ par des dosages d'ADN sur noyaux isolés.

P. MANDEL: Je ne pense pas que l'on puisse s'attendre de la part d'une détermination biochimique d'ADN après isolement des noyaux, à pouvoir affirmer une différence quand celle-ci est de l'ordre de 12 à 15%. Les erreurs dans le comptage des

calculs et les dosages chimiques sont trop élevés, à moins de faire un nombre de mesures considérables. Ainsi par dosage chimique de la quantité moyenne d'ADN du noyau au cours de l'hypertrophie rénale compensatrice nous n'avons pas trouvé de différence. Mais nous ne pouvons pas affirmer qu'il n'existe pas de différence inférieure à 12 ou 15%. Par contre l'existence d'un ADN métabolique qui pourrait varier à côté de l'ADN génétique paraît très vraisemblable.

F. KASTEN: We have heard so much about DNA constancy that it seems very legitimate to examine critically the bases for the interpretations put forth here.

(1) Are all tissues to be compared fixed together handled alike prior to paraffin embedding, mounted on the same slide, and stained alike?

(2) Are there any statistical differences between DNA values of different animals of a given group.

(3) I do not understand how you can end up showing DNA values with four numerical figures and even five figures when to begin with the original data are only estimated to the third figure.

J. FAUTREZ:

(1) Tous les tissus comparés dans une même série expérimentale proviennent d'animaux tués simultanément. Ils sont manipulés ensemble jusqu'à l'inclusion, et une coupe de chaque tissu est portée chaque fois sur une même lame porte-objet. On s'assure ainsi d'un Feulgen absolument homogène.

(2) Dans chaque groupe il existe des différences individuelles de la teneur moyenne en ADN. Ces différences sont certainement statistiquement significatives. Sur un groupe de cinq animaux le *f*-test montre cependant que tous les noyaux mesurés appartiennent à une population homogène. Les valeurs individuelles moyennes présentent des oscillations autour d'une valeur d'équilibre. Il est donc permis de comparer par un *f*-test deux populations homogènes en partant des *pools* des mesures effectuées dans les différents individus de deux groupes.

(3) Comme la distribution des valeurs individuelles de la teneur en ADN des noyaux mesurés n'est pas une distribution normale mais bien log.-normale, on ne peut calculer les paramètres en partant des chiffres naturels, mais bien en partant de leurs logarithmes. Les nombres à 4 ou 5 décimales auxquels Monsieur KASTEN fait allusion sont tout simplement les logarithmes des chiffres mesurés.