

## CONTRIBUTION CYTOCHIMIQUE ET HISTOAUTORADIOGRAPHIQUE À L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME ET DE LA SYNTHÈSE DES ADN DANS DES CELLULES ANIMALES CULTIVÉES *IN VITRO*—II

### ÉTUDE DES ACIDES DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES DANS DES CELLULES ANIMALES SOUMISES VIVANTES À L'ACTION DE DÉSOXYRIBONUCLÉASES NEUTRE OU ACIDE. SYNTHÈSE ET ACCUMULATION CYTOPLASMIQUES D'ADN

M. CHÈVREMONT, E. BAECKELAND et S. CHÈVREMONT-COMHAIRE

Institut d'Histologie, Université de Liège, Liège, Belgique

**Abstract**—The metabolism and the synthesis of DNA are studied in cells (cultures of fibroblasts) which have been placed, alive, in contact either with neutral deoxyribonuclease or with an acid deoxyribonuclease extracted from the thymus. The present paper deals mainly with the results obtained by the Feulgen reaction and more especially with those obtained by cytophotometric quantitative estimations on individual cells. Results of histoautoradiographic techniques based on the incorporation of thymidine labelled by tritium as a "marker" are also specially considered.

Under the influence of high concentrations in one or the other of these enzymes, the mitotic activity of the fibroblasts is zero or low. Once, however, a mitosis has begun, it proceeds normally. The chondriome is highly modified and mitochondria are transformed into "balls", "inert", which become numerous in time.

The quantitative measurements of DNA and the histoautoradiographs show clearly that for the two enzymes the percentage of so-called "tetraploid" values of DNA in the interkinetic nuclei and the percentage of labelled nuclei are markedly diminished compared with the corresponding controls. These diminutions are, however, generally smaller than that of the mitotic index. A synthesis of DNA thus takes place but not frequent and not always followed by mitosis.

In the case of the two enzymes, the mean DNA content of the nuclei in interkinetic pause (diploid value) is not reduced. This underlines its constancy in the living cell in spite of the activity of the enzymes added to the cultures.

An important difference between the two enzymes appears which concerns the cytoplasm. As a matter of fact numerous modified mitochondria are clearly Feulgen positive in the case of acid DNase but not of the neutral one. The quantity of DNA so present in the cytoplasm can reach approximately nine-tenths of that of the nucleus (diploid value). Histoautoradiographs demonstrate that these cytoplasmic DNA do not come from the nucleus. A series of facts and arguments show that not only there is an *accumulation* of DNA in the modified mitochondria but that also a *synthesis* of DNA in the cytoplasm takes place.

These results together with some other observations of ours favour our hypothesis that a synthesis of DNA (or of intermediate material), normally takes place in the cytoplasm, at least at certain periods. More precisely, this synthesis should take place at mitochondrial level with a subsequent passage into the nucleus. In some particular conditions leading to disturbances of the chondriome, these DNA should be accumulated in mitochondria being modified and "immobilised", in which they are thus easily detected.

SOUMIS vivants à de fortes concentrations de désoxyribonucléase (DNase) neutre ou de désoxyribonucléase acide, les fibroblastes d'embryons de poulet sont profondément influencés et modifiés. Pour ces expériences, ont été utilisées soit de la DNase neutre ou I, de marque GBI ou Worthington, à des concentrations finales de  $\frac{1}{300}$  à  $\frac{1}{1200}$ , soit une DNase acide ou de type II, spécialement préparée à partir de thymus de veau (activité finale par ml correspondant en tubes à environ 30-37,5 unités selon Kunitz par ml et à pH 4,5; FREDERICQ et OTH, 1957; FREDERICQ *et al.*, 1960).

Dans ces conditions et à des concentrations élevées, la croissance des cultures est profondément inhibée. Les effets de ces enzymes ont été étudiés: (1) du point de vue cytologique, notamment par des examens en contraste de phase et à fort grossissement de cellules vivantes; (2) du point de vue cytochimique, particulièrement par des dosages cytophotométriques dans des cellules mesurées individuellement après réaction de Feulgen (pour la mise en évidence histochimique des acides désoxyribonucléiques ADN); et (3) par histoautoradiographie après incorporation de thymidine tritiée, précurseur quasi spécifique d'ADN.\*

#### MODIFICATIONS CELLULAIRES

Les altérations cytologiques des fibroblastes ont été décrites en détail ailleurs (CHÈVREMONT et CHÈVREMONT-COMHAIRE, 1957a,b; CHÈVREMONT *et al.*, 1959c). Nous en rappelons ici quelques points importants.

Le chondriome des fibroblastes est profondément modifié (Fig. 1): de nombreux chondriosomes sont transformés en éléments sphériques qui perdent leur "mobilité" caractéristique; leur nombre augmente à la longue par formation de nouveaux chondriosomes filamenteux qui à leur tour se transforment en "boules". L'activité mitotique est nulle ou faible. Pour "entrer en mitose", il est indispensable que la cellule possède encore une quantité suffisante de chondriome normal, mais quand une mitose se produit, elle évolue normalement. Différents arguments indiquent que nous avons affaire ici à un nouvel exemple d'"inhibition préprophasique" de la mitose (CHÈVREMONT et CHÈVREMONT-COMHAIRE, 1953).

Si l'aspect morphologique des chondriosomes modifiés est le même sous l'influence de la DNase neutre et de la DNase acide, ces éléments présentent des caractères cytochimiques tout à fait particuliers dans le cas de la DNase acide (Fig. 2 et 3): celle-ci modifie profondément, et d'une manière spéciale, le métabolisme des ADN cellulaires.

#### PRÉSENCE D'ADN DANS DES CHONDRIOSOMES MODIFIÉS PAR LA DNASE ACIDE

Dès 1956-1957, deux d'entre nous ont signalé, pour la première fois, la présence d'ADN dans le cytoplasme de cellules normales de vertébrés et ont attiré l'attention sur l'intérêt que ce fait présente pour l'étude du métabolisme cellulaire des ADN. En effet, beaucoup de chondriosomes en "boules" sous l'influence de la DNase acide contiennent des ADN, tels qu'ils sont mis en évidence par la réaction de Feulgen (CHÈVREMONT et CHÈVREMONT-COMHAIRE, 1957a,b) (voir Fig. 3). Il s'agit bien d'une véritable réaction de Feulgen, elle a été contrôlée de plusieurs

\* Ces recherches ont été subventionnées par le Centre Anticancéreux près l'Université de Liège et le Centre National Belge de Génétique.

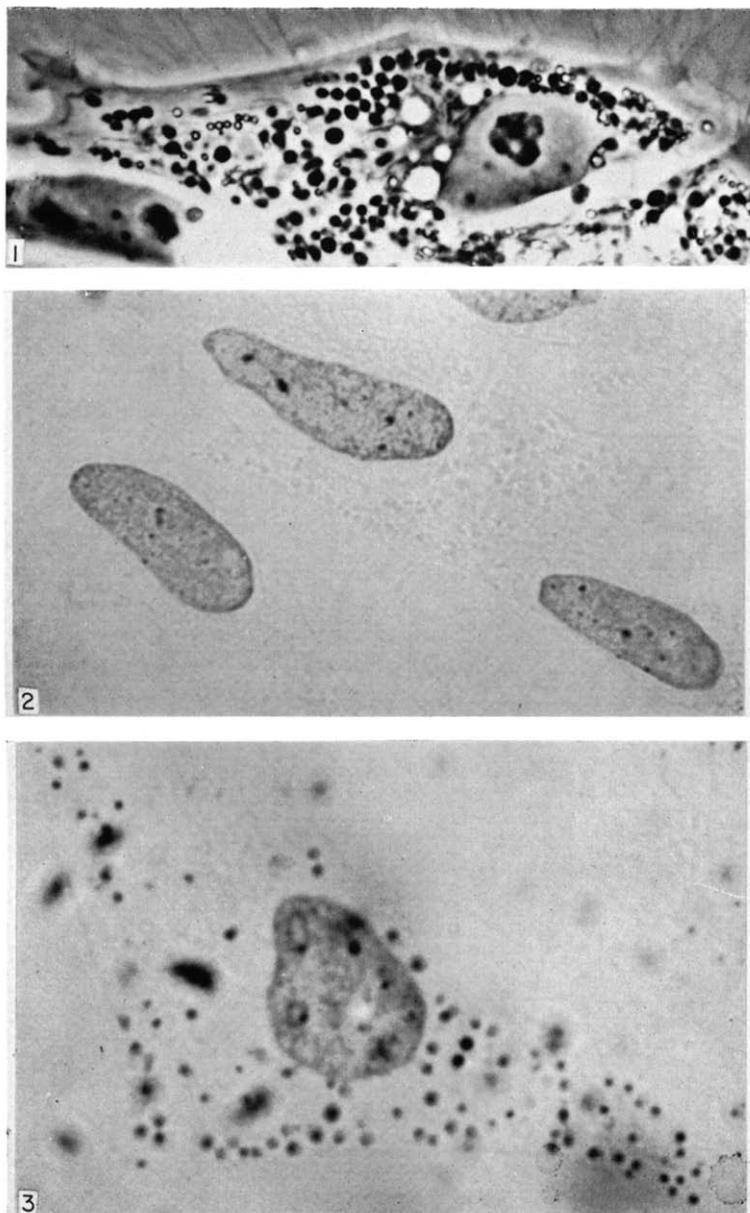


FIG. 1. Fibroblaste photographié vivant en contraste de phase. Culture au milieu nutritif de laquelle de la DNase acide a été ajoutée à la concentration finale de  $\frac{1}{50}$ . Culture âgée de 48 hr. Dans le cytoplasme, on distingue de nombreux chondriosomes modifiés en "boules" ainsi que quelques chondriosomes filamentueux d'aspect normal.

FIG. 2. Réaction de Feulgen (pour la mise en évidence cytochimique des ADN) dans une culture traitée vivante par de la DNase neutre. Culture âgée de 48 hr. On voit les noyaux, bien positifs, de trois cellules ainsi que, peu distinctement, des grains cytoplasmiques non colorés (Feulgen —) qui correspondent à des chondriosomes en "boules". ( $\times 1700$ .)

FIG. 3. Réaction de Feulgen dans une culture traitée vivante par de la DNase acide. Culture âgée de 48 hr. On voit une cellule assez étalée, avec son noyau et son cytoplasme chargé de grains colorés, c'est-à-dire Feulgen + (en noir ici); ces derniers correspondent à des chondriosomes modifiés, semblables à ceux de la Fig. 1. ( $\times 2600$ .) (CHÈVREMONT et CHÈVREMONT-COMHAIRE, 1957a, b).

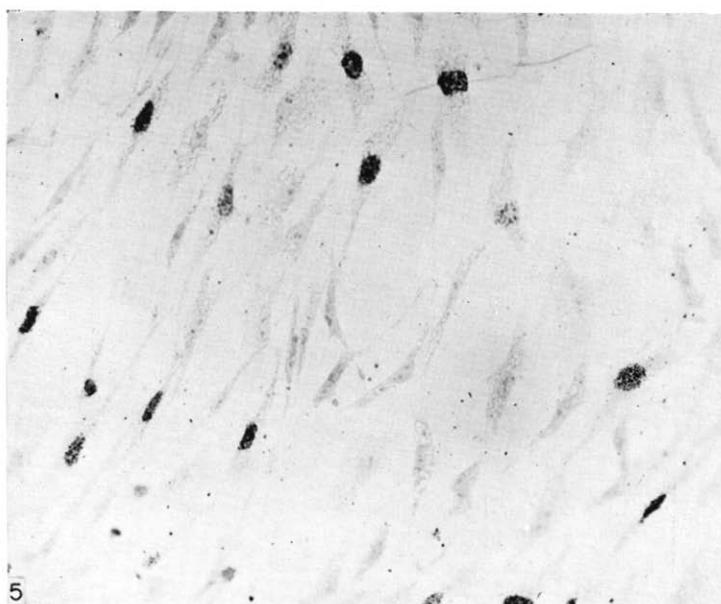
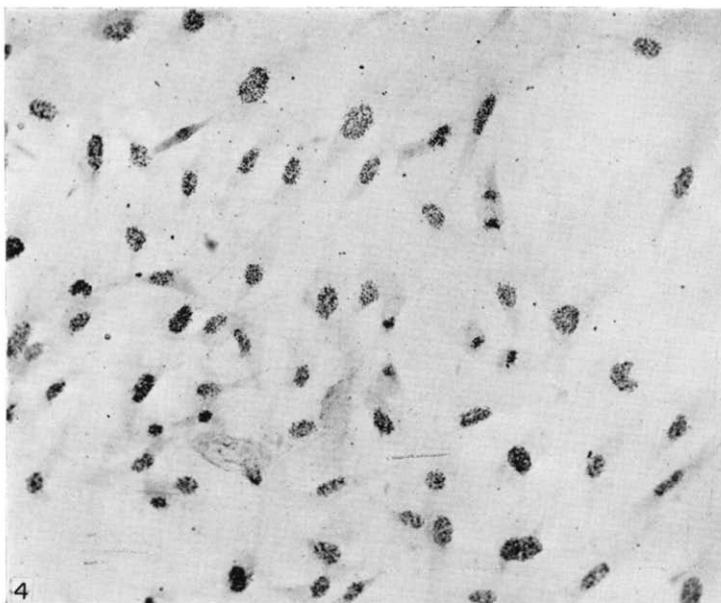


FIG. 4. Histoautoradiographie d'une culture témoin. Microphotographie à moyen grossissement. Culture normale au milieu nutritif de laquelle de la thymidine tritiée (solution (b)) a été ajoutée dès l'expansion; culture âgée de 48 hr. Les grains noirs correspondent aux grains d'argent développés dans l'émulsion aux sites de radioactivité, c'est-à-dire en regard des endroits où de la thymidine tritiée a été incorporée. Légère coloration de fond de la culture, par une hématoxiline; il en est de même pour Figs. 5 à 8. Faible *background*. Dans cette figure, pratiquement tous les noyaux sont "marqués"; on y reconnaît cinq mitoses, marquées elles aussi (une métaphase et quatre ana-télophases). ( $\times 312$ .)

FIG. 5. Histoautoradiographie d'une culture traitée par de la DNase acide. Culture âgée de 48 hr; solution (b) de thymidine; concentration finale de l'enzyme  $\mu$ . Une minorité de noyaux sont marqués. Dans cette figure, pas de mitoses. ( $\times 312$ .)

manières. La quantité totale d'ADN ainsi présente dans le cytoplasme d'une cellule peut atteindre approximativement neuf-dixièmes de la quantité d'ADN contenue dans le noyau (valeur diploïde), comme l'ont montré des dosages cytophotométriques dont il est question ci-après.

Il y a donc accumulation nette d'ADN au niveau de chondriosomes modifiés. Semblable localisation cytoplasmique d'ADN qui, par certains aspects, rappelle des "inclusions virales", a aussi été observée dans deux autres cas, sans qu'il y ait eu addition aux cultures de DNase acide. En effet, quand des chondriosomes sont modifiés sous l'influence du trihydroxy-N-méthylindole, "inhibiteur préprophasique" de la mitose (CHÈVREMONT et CHÈVREMONT-COMHAIRE, 1953), beaucoup donnent une réaction de Feulgen positive, bien que leur nombre soit moins élevé et que l'intensité de la réaction soit en général plus faible pour chacun d'eux (BAECKELAND *et al.*, 1958). Nous en avons aussi retrouvé dans des cellules simplement refroidies vers 20°, chez lesquelles le chondriome est également modifié (observations non publiées de CHÈVREMONT et CHÈVREMONT-COMHAIRE 1958). Notons que dans ces divers cas, il s'agit d'expériences d'assez longue durée (de 1 à 3 jours).

### DOSAGES CYTOPHOTOMÉTRIQUES D'ADN

Nous avons effectué une série de dosages cytophotométriques après réaction de Feulgen sur cellules individuelles, fixées aux vapeurs d'acide osmique puis à l'alcool éthylique à 80 vol. %. L'appareil utilisé est celui que notre collaborateur H. FIRKET a réalisé et mis au point dans notre laboratoire (FIRKET, 1956, 1958) d'après les conseils de Mme C. LEUCHTENBERGER (appareillage selon POLLISTER et MOSES, POLLISTER et ORNSTEIN, etc.); l'équipement électrique est d' "Electrophysique" (Bruxelles). Notre installation présente entre autres l'avantage de fournir une microphotographie de chaque noyau mesuré. Les mesures s'effectuent en lumière visible, à une ou deux longueurs d'onde (monochromateur de Leitz). Pour les noyaux intercinétiques des cultures de tissus d'embryons de Poulet, la précision obtenue (déviation standard) pour les valeurs individuelles est de l'ordre de 11 à 12,5% par rapport à la moyenne (FIRKET, 1958, p. 43; BAECKELAND). Exceptionnellement, pour des séries de noyaux où les extinctions faibles étaient fréquentes, le coefficient de variation s'est parfois élevé jusqu'à 15%. Pour les cellules de Mammifères, il est de l'ordre de 8 à 10%, avec notre appareil. Quant aux mitoses, elles ont été mesurées par la méthode à deux longueurs d'onde.

#### *Désoxyribonucléase neutre*

Ces mesures quantitatives montrent que la teneur moyenne en ADN des noyaux en repos, c'est à dire la valeur diploïde, n'est pas abaissée (voir Tableau 1). Par contre, le pourcentage des valeurs dites tétraploïdes en ADN, qui, dans notre matériel, correspondent aux noyaux encore intercinétiques mais en train d'effectuer ou ayant déjà effectué la synthèse—préprophasique—d'ADN, est nettement diminué par rapport aux cultures témoins correspondantes.

Quant aux dosages effectués sur des figures mitotiques, ils nous ont fourni, pour les cultures traitées par l'enzyme, les mêmes résultats que pour les témoins. En

TABLEAU 1. ACTION SUR LES ADN DE LA DNASE NEUTRE AJOUTÉE  
AUX FIBROBLASTES VIVANTS

	Cultures traitées $\frac{1}{4}$ d <sub>0</sub>			Cultures traitées $\frac{1}{8}$ d <sub>0</sub>			Cultures témoins		
	Index mitotique (%)	% de valeurs "tétraploïdes"	Valeur diploïde moyenne	Index mitotique (%)	% de valeurs "tétraploïdes"	Valeur diploïde moyenne	Index mitotique (%)	% de valeurs "tétraploïdes"	Valeur diploïde moyenne
34 hr	±0	10	5,7	2	13	5,6	19	23,3	5,7
48 hr	9,5	7	4,7	10,5	9,1	4,5	14	21,9	4,9

L' "index mitotique" correspond au nombre de figures mitotiques pour 1000 cellules; il est établi d'après des numérasions portant au moins sur 1000 cellules, parfois jusqu'à plus de 2000. Avec d'autres auteurs, nous qualifions de "tétraploïdes" les valeurs en ADN dépassant la "valeur diploïde" de 50 à 100% ou même un peu plus; rappelons aussi que ces termes désignent des quantités d'ADN et non des nombres de chromosomes ou de génomes.

Ces teneurs en ADN sont exprimées (dans les trois tableaux et dans le texte) en unités arbitraires. Ces dernières sont les mêmes pour chaque groupe ou série de cultures; pour chacun de ceux-ci, la réaction de Feulgen est effectuée en même temps et de la même façon sur les cultures traitées par l'enzyme et sur les témoins correspondants. Le nombre d'unités exprimant la teneur en ADN peut donc varier d'une expérience à l'autre; il faut le comparer chaque fois aux chiffres obtenus pour les témoins correspondants.

d'autres termes, lorsque la mitose se produit dans ces conditions, les teneurs en ADN ne sont pas modifiées.

Certaines précautions doivent être prises pour éviter que la DNase neutre ne continue à agir sur les cellules mortes, pendant et après la fixation, et n'hydrolyse les ADN des cellules fixées (CHÈVREMONT *et al.*, 1958a). Nous avons notamment cherché à inactiver l'enzyme en ajoutant, à l'alcool du fixateur, du fluorure de sodium, inhibiteur de cet enzyme.

#### Désoxyribonucléase acide

Pour cet enzyme, nous devons considérer à la fois noyau et cytoplasme. En ce qui concerne ce dernier, nous avons signalé plus haut que des ADN étaient nettement décelables par la réaction de Feulgen dans de nombreux chondriosomes modifiés sous l'influence de la DNase acide. Bien que le dosage soit à la limite des possibilités de notre appareil, nous avons pu apprécier, dans les conditions favorables, l'ordre de grandeur des quantités d'ADN cytoplasmique (méthode à deux longueurs d'onde; pour plus de détails et la discussion, cf. CHÈVREMONT, *et al.*, 1959c). C'est surtout après 2 et 3 jours et pour de fortes concentrations en enzyme que de nombreux chondriosomes en "boules" sont nettement positifs à la réaction de Feulgen (Fig. 3). Bien que leur nombre soit variable, il atteint souvent une soixantaine par cellule. Pour des grains mesurés isolément, nous avons pu estimer que la richesse en ADN de chacun d'eux correspond, en moyenne, à 1,6% de la valeur diploïde en ADN du noyau. Dans les conditions favorables, la quantité d'ADN présente dans le cytoplasme de ces cellules s'élève ainsi approximativement aux neuf-dixièmes de celle du noyau. Au total, la teneur en ADN par cellule (noyau plus cytoplasme) ne dépasse donc pas la valeur tétraploïde proprement dite (quatre ADN).

Malgré la présence inhabituelle d'ADN dans le cytoplasme en quantité relativement considérable et malgré ses effets sur l'activité mitotique, la DNase acide ne modifie pas la moyenne de la teneur en ADN des noyaux en repos intercinétique, du moins dans des proportions significatives (voir Tableaux 2 et 3). Celle-ci reste

TABLEAU 2. HISTOGRAMMES DES TENEURS EN ADN DE NOYAUX INTERCINÉTIQUES DANS DES CULTURES TRAITÉES VIVANTES PAR DE LA DNASE ACIDE.

Cultures âgées de 48 heures, appartenant à une même série. A gauche, cultures témoins (trois); 190 noyaux mesurés. A droite, cultures traitées par DNase acide à  $\frac{1}{100}$ ; 120 noyaux mesurés (quatre cultures). En abscisses, la quantité d'ADN exprimée en unités arbitraires; en ordonnées, fréquence (%) des valeurs des différentes classes.

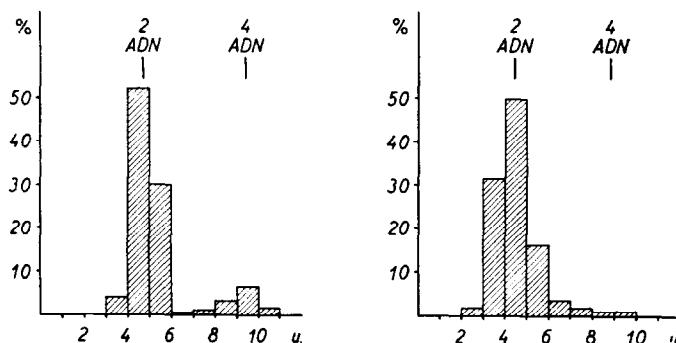


TABLEAU 3. EFFETS D'UNE DÉSOXYRIBONUCLÉASE ACIDE SUR DES FIBROBLASTES

	Cultures traitées vivantes par l'enzyme			Cultures témoins correspondantes		
	Index mitotique (%)	% valeurs "tétraploïdes"	Valeur diploïde moyenne	Index mitotique (%)	% valeurs "tétraploïdes"	Valeur diploïde moyenne
1 jour	0 1	0,8 2	3,8	3	8	3,9
2 jours	0,5 0	2,5 3	4,2 4,8	17,5 12	11,5 13	4,75 4,9
3 jours	0 0	13 26	4,6	8	10	4,6
11 jours (3 passages + 48 hr)		21	5,2		24	5,1
13 jours (4 passages + 48 hr)	4	5,5	4,6	15,5	28	4,5

N.B.: Les nombres situés sur une même ligne horizontale correspondent à des cultures traitées par la réaction de Feulgen en même temps et exactement de la même façon: les mesures ont été faites à des moments aussi rapprochés que possible (voir aussi la légende du Tableau 1). Pour les cultures non repiquées (=fixées 1, 2 ou 3 jours après l'explantation), la concentration finale en DNase acide était  $\frac{1}{100}$ ; pour les souches (cultures âgées de 11 et 13 jours), la concentration utilisée a été légèrement inférieure, de façon à obtenir une croissance faible, mais suffisante pour les découpages et transplantations.

donc constante, dans les limites d'erreurs de la méthode. Que la cellule contienne ou non des "boules" Feulgen positives, les valeurs diploïdes moyennes sont semblables; par exemple 4,7 pour des cellules à nombreuses boules Feulgen+, 4,5 pour des cellules à rares "boules" positives et 4,6 pour le témoin correspondant.

Fréquemment aussi, les nucléoles donnent une nette réaction de Feulgen, sous l'influence prolongée de la DNase acide (CHÈVREMONT ET CHÈVREMONT-COMHAIRE, 1957; CHÈVREMONT *et al.*, 1959c). Déjà assez fréquent dans les cultures non repiquées qui sont âgées de 3 jours, cet aspect s'observe dans la plupart ou même dans presque toutes les cellules appartenant à des souches. En nous plaçant dans les meilleures conditions pratiques possibles, nous avons cherché à estimer la quantité de ces ADN nucléolaires; en accord avec les examens directs, les ADN semblent alors plus concentrés au niveau des nucléoles que dans le reste du noyau. Mais dans ces conditions, la moyenne de la teneur totale du noyau en ADN n'est pas modifiée de façon significative.

Quant au pourcentage des valeurs "tétraploïdes" en ADN dans des cellules d'aspect intercinétique, il est fortement diminué, comme pour la DNase neutre (voir Tableaux 2 et 3).

Pour la teneur en ADN des figures mitotiques, il n'y a rien de particulier à signaler.

#### ÉTUDE HISTOAUTORADIOGRAPHIQUE DE L'INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIÉE AU NIVEAU DES NOYAUX

##### *En présence de DNase neutre*

Nous avons vu plus haut que la DNase neutre, à des concentrations élevées, inhibe fortement la croissance des cultures et l'activité mitotique des fibroblastes. Lorsque de la thymidine tritiée a été ajoutée au milieu nutritif de cultures correspondantes\*, l'examen des préparations histoautoradiographiques montre, en résumé, les faits suivants (CHÈVREMONT *et al.*, 1959d). Le pourcentage des noyaux d'aspect intercinétique ayant incorporé de la thymidine tritiée est fortement diminué. Par exemple, atteignant 67% après 24 heures et près de 100% après 48 heures dans les témoins, il s'abaisse à 13% après 24 heures et 14% après 48 heures

\* La thymidine tritiée que nous avons utilisée le plus souvent (de marque Schwarz, U.S.A.) a une activité spécifique soit de 0,36 c/m-mole soit de 1,8 c/m-mole. Dans le premier cas, la thymidine a une concentration finale, dans le milieu de culture, de  $0,8 \times 10^{-5}$  M et une radioactivité de 0,028 mc/ml (solution (b)); dans le second cas, la même concentration,  $0,8 \times 10^{-5}$  M mais une activité de 0,14 mc/ml (solution (c)). Dans les conditions où nous nous sommes placés, la thymidine n'altère pas la croissance des cultures ni les caractères cytologiques des cellules. (Nos modalités techniques ont été décrites ailleurs (CHÈVREMONT *et al.*, 1959a, d.) C'est surtout avec la seconde solution de thymidine tritiée que nous avons eu les résultats les plus démonstratifs (voir Fig. 8). Quand il s'agit de très petites quantités locales de thymidine, il est en effet indispensable d'utiliser une thymidine suffisamment radioactive, en particulier ici pour mettre en évidence un marquage significatif du cytoplasme.

Des cultures de tissus dont le milieu nutritif n'a pas été additionné de thymidine tritiée, ont été soumises aux mêmes manipulations que les préparations histoautoradiographiques habituelles (fixation histologique, lavage, placement du *stripping film*, etc.). Dans ces conditions, le *background* était similaire à celui des autres préparations renfermant de la thymidine tritiée ou plus faible encore. En ce qui concerne nos autres cultures, ce *background* peut être dû à deux facteurs: un certain autodéveloppement de l'émulsion photographique et la radioactivité d'un peu de thymidine restée telle quelle dans le milieu ou dans la cellule, c'est-à-dire non incorporée dans des ADN et non totalement éliminée par lavage.

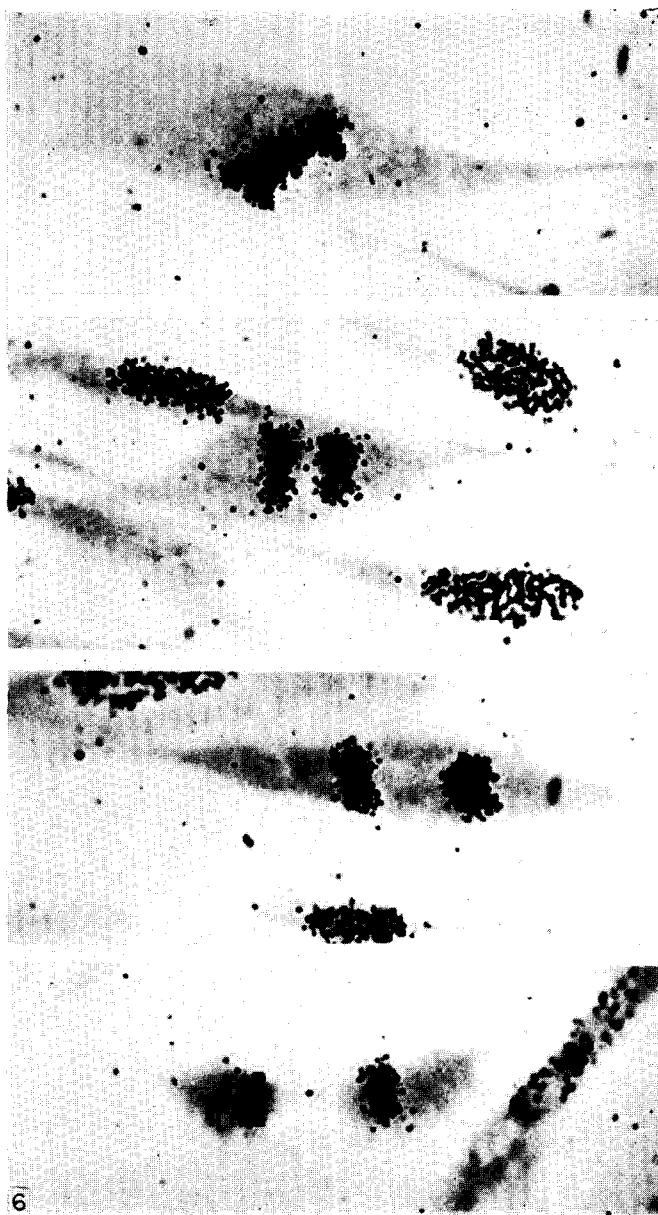
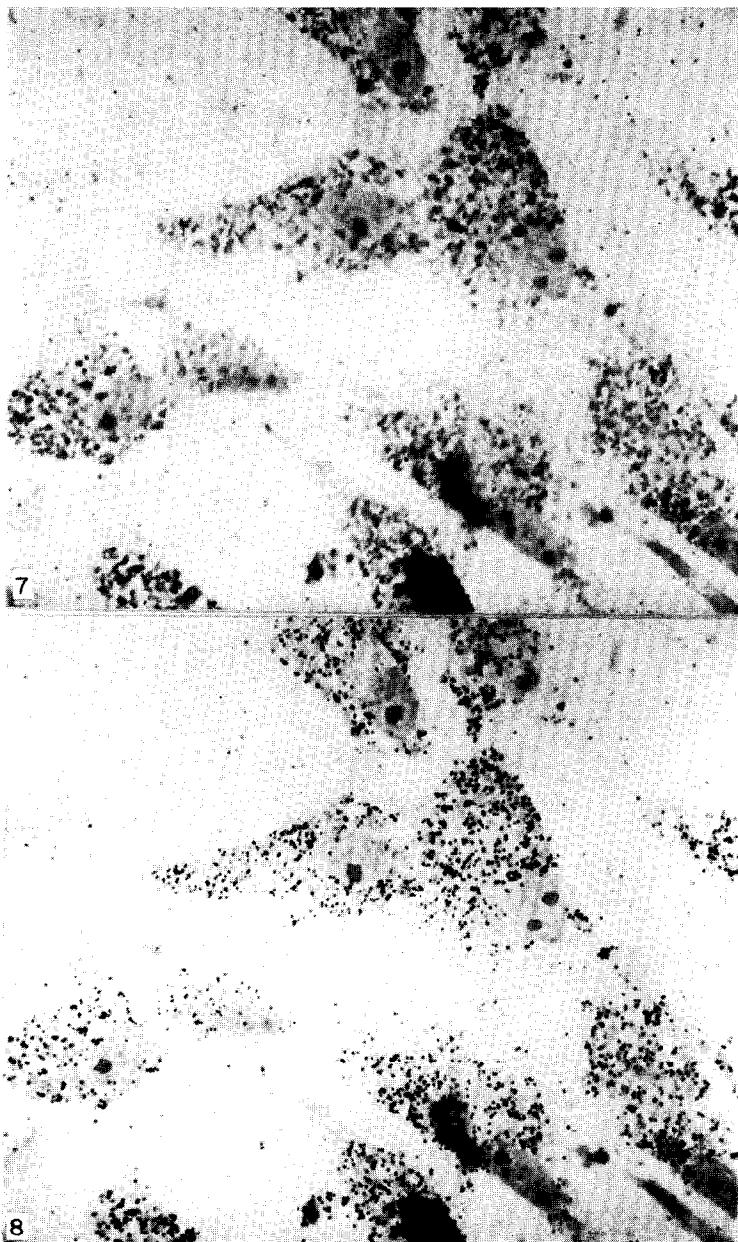


FIG. 6. Plusieurs noyaux intercinétiques et figures mitotiques marqués par de la thymidine tritiée (solution (b)). Microphotographies à fort grossissement d'histoautoradiographies de cultures témoins, âgées de 40 hr. De haut en bas: métaphase, anaphase, ana-télophase et télophase. Le "marquage" est bien localisé à hauteur des groupes chromosomiques et des noyaux. Le cytoplasme des cellules en mitose et celui des cellules intercinétiques ne sont pas marqués, mais ils sont plus ou moins visibles, grâce à une légère coloration histologique. Quant aux grains noirs dispersés et apparents entre les cellules, ils correspondent à un léger "voile de fond" (*background*). ( $\times 1365$ .)



Figs. 7 et 8. Mêmes cellules photographiées avec deux mises au point différentes, dans une préparation histoautoradiographique d'une culture dont le milieu nutritif contenait de la DNase acide ( $\text{Ac}_2$ ) et de la thymidine tritiée (solution (c)). (× 912.)

FIG. 7. Mise au point surtout sur le cytoplasme des cellules, montrant notamment des "boules" grisâtres qui sont des chondriosomes modifiés.

FIG. 8. Mise au point sur les grains d'argent situés dans l'émulsion photographique étroitement superposés aux cellules. Distance approximative entre les plans correspondant aux deux mises au point: 0,5-1  $\mu$ . Ces grains indiquent les sites cellulaires où se trouve de la thymidine radioactive. On voit que les cytoplasmes sont nettement marqués et tranchent sur les espaces intercellulaires. Au bas des deux figures, portion d'un noyau marqué; les autres noyaux visibles dans les figures (avec leurs nucléoles) ne sont pas marqués.

pour la concentration finale en DNase neutre de  $\frac{1}{400}$ , et à 32 et 44% pour celle de  $\frac{1}{800}$ . Les mitoses, peu nombreuses, sont marquées de la façon habituelle. Aucun marquage significatif n'a été observé au niveau du cytoplasme. Ici encore, des précautions ont été prises pour éviter une action éventuelle de la DNase sur les cellules fixées.

#### *En présence de DNase acide*

Comme avec l'enzyme précédent et alors que l'activité mitotique des cultures est faible ou nulle, le pourcentage de noyaux intercinétiques ayant incorporé de la thymidine- $^3\text{H}$  ( $^3\text{HTDN}$ ) est de l'ordre de 20 à 26% pour les 30 à 48 premières heures alors qu'il s'élève à 90-95% et plus dans les noyaux des témoins correspondants (CHÈVREMONT *et al.*, 1959a, d) (voir Figs. 4 et 5).

Mais, dans les conditions favorables, un fait particulier se révèle qui, à notre connaissance n'a jamais été signalé pour les cellules somatiques: le cytoplasme des cellules traitées par notre DNase acide est nettement marqué; en d'autres termes, de la thymidine a été incorporée dans le cytoplasme (Fig. 8). Les grains d'argent, visibles dans l'émulsion photographique étroitement superposée aux cellules, semblent bien être en rapport avec les "boules" mitochondriales, situées immédiatement en dessous (Fig. 7). Il ne s'agit pas d'un phénomène exceptionnel car, dans les conditions favorables (concentration de l'enzyme, radioactivité suffisante de la  $^3\text{HTDN}$ , *loc. cit.*), pratiquement toutes les cellules sont marquées. Toutefois, il existe une certaine variabilité dans l'intensité du marquage cytoplasmique. Quant aux noyaux, ils sont soit marqués soit non marqués; mais, fait à souligner, nous n'avons jamais observé, dans ces conditions, de noyau marqué avec cytoplasme correspondant non marqué. C'est-à-dire que le marquage du cytoplasme n'est pas postérieur à celui du noyau.

### CONCLUSIONS

Dans les conditions où nous nous sommes placés, l'activité mitotique des fibroblastes est fortement inhibée, ou même supprimée par la DNase neutre ou par la DNase acide.\* Mais la teneur en ADN des noyaux en repos intercinétique n'apparaît pas modifiée. En dehors de phénomènes mitotiques, la quantité d'ADN dans le noyau vivant reste donc constante—aux erreurs techniques de la méthode près—malgré l'activité des enzymes employés; d'autre part, il n'y a pas non plus d'incorporation nucléaire de thymidine. Ces derniers points font ressortir en outre la "protection" dont jouissent les ADN nucléaires dans la cellule vivante contre ces enzymes, même utilisés à dose considérable. Il est vraisemblable que ces enzymes ajoutés aux cultures pénètrent dans la cellule mais, comme on n'observe pas de preuve directe de leur intervention dans le noyau, on peut admettre qu'ils ne pénètrent pas dans ce dernier (obstacle constitué par la membrane nucléaire, par exemple) ou, s'ils le font, qu'ils se trouvent en présence d'"inhibiteurs" puissants. Ces résultats diffèrent de ceux fournis par la ribonucléase qui, elle, est

\* Pendant la rédaction du présent travail, nous avons eu connaissance de recherches effectuées avec de la désoxyribonucléase neutre ou I très diluée sur des œufs, par ZAHN *et al.* (1959a, b). À la dilution de 1/300 000 cet enzyme favorise le développement des œufs fécondés de *Sphaerechinus granularis* (ZAHN *et al.*, 1959a) et d'*Arbacia pustulosa* (ZAHN *et al.*, 1959b).

capable de pénétrer dans le noyau, ou du moins sous l'influence de laquelle on voit des signes d'atteinte d'éléments nucléaires dans la cellule traitée vivante: perte des acides ribonucléiques (ARN) nucléolaires, altération de la chromatine, etc. (CHÈVREMONT et CHÈVREMONT-COMHAIRE, 1957).

Une incorporation de thymidine et une synthèse d'ADN se produisent cependant dans un pourcentage peu élevé de noyaux, vraisemblablement en rapport avec une certaine préparation à la mitose, cette dernière ne se réalisant que rarement.\*

Le chondriome est profondément perturbé, à la fois par la DNase neutre et la DNase acide. Pour différentes raisons, nous pensons bien qu'il s'agit ici d'une "inhibition préprophasique" de la mitose liée, au moins en partie, à l'atteinte du chondriome (CHÈVREMONT et CHÈVREMONT-COMHAIRE, 1953; CHÈVREMONT, 1959; etc.).

La réaction de Feulgen, d'une part, les techniques histoautoradiographiques, d'autre part, ont donné des résultats très différents pour les deux enzymes employés mais concordants pour un même enzyme. Seule notre DNase acide provoque en effet une *accumulation* nette d'ADN dans le cytoplasme, plus précisément au niveau de chondriosomes modifiés (réaction de Feulgen nettement positive). De son côté, l'histoautoradiographie démontre en outre qu'il y a incorporation de thymidine dans de nouveaux ADN à l'intérieur du cytoplasme. Nous pensons qu'il s'agit, au moins en partie, des mêmes ADN que ceux révélés par la réaction de Feulgen au niveau de chondriosomes modifiés. D'après ce que nous avons rappelé plus haut, nous pouvons en effet exclure que ces ADN proviendraient du noyau, qu'ils seraient passés secondairement de celui-ci dans le cytoplasme.

Nous avons discuté ailleurs la signification de nos résultats. Sans vouloir proposer ici une interprétation définitive, nous pouvons dire que dans certaines conditions, tout se passe comme si, lorsqu'ils sont modifiés et "immobilisés", les chondriosomes ne se "déchargeaient" pas des ADN qui s'y seraient formés—ou de produits intermédiaires, précurseurs—alors que normalement ils iraient les céder au noyau. Ainsi des ADN s'y accumuleraient en quantité aisément décelable par la technique cytochimique. Une accumulation semblable d'ADN a aussi été signalée, dans des cultures de tissus, sous l'influence du trihydroxy-N-méthylindole (CHÈVREMONT et CHÈVREMONT-COMHAIRE, 1953; BAECKELAND *et al.*, 1958) ou lors

\* Tandis que la réaction cytochimique de Feulgen nous renseigne sur la *quantité d'ADN présente au moment du prélèvement* dans une structure donnée (et non sur la qualité de ces ADN), le marquage obtenu par histoautoradiographie basée sur l'emploi de thymidine tritiée, indique, on le sait, qu'une incorporation de cette substance est en train d'avoir lieu ou a déjà eu lieu; en d'autres termes, ce marquage signifie qu'une synthèse d'ADN se produit ou s'est produite depuis un temps plus ou moins long. Par exemple, dans le cas d'une culture de tissus âgée de 48 hr et en contact avec de la thymidine-<sup>3</sup>H depuis l'expansion, un noyau intercinétique peut être "marqué" soit parce que cette cellule est en train d'effectuer sa synthèse préprophasique d'ADN, soit parce qu'elle l'a déjà effectuée (se trouvant ainsi à l'"intervalle post-synthèse"), soit encore parce qu'il peut s'agir d'une cellule-fille revenue en repos intercinétique après une mitose (ou même déjà en train d'effectuer une nouvelle synthèse préprophasique d'ADN). Si, par ailleurs, une cellule subit plusieurs mitoses consécutives, en présence de thymidine-<sup>3</sup>H, des ADN sont synthétisés ainsi à plusieurs reprises et il peut y avoir une quantité de thymidine dans les cellules-filles correspondant à un *effet cumulatif*. Nous ne discuterons pas ici la validité d'une appréciation quantitative du marquage, d'après le dénombrement des "grains d'argent développés", certaines causes d'erreur pouvant intervenir. Elle nous paraît cependant possible, de façon approximative et en faisant certaines réserves.

Les considérations ci-dessus nous paraissent souligner l'intérêt de la confrontation des résultats des deux méthodes.

de certaines modifications de température (CHÈVREMONT *et al.*, 1958). On peut donc se demander si, au moins à certains moments et probablement en rapport avec la préparation à la mitose, les chondriosomes ne possèdent pas normalement le pouvoir de synthétiser des ADN, ou des produits intermédiaires. Dans certains cas, quand ces éléments seraient perturbés, l'ADN s'accumulerait à leur niveau. Evidemment, il ne suffit pas qu'un chondriosome apparaisse modifié morphologiquement pour qu'on puisse nécessairement y déceler de l'ADN.

#### RÉSUMÉ

Le métabolisme et la synthèse d'ADN sont étudiés dans des cellules (cultures de fibroblastes) qui ont été mises, vivantes, en présence soit de désoxyribonucléase neutre soit d'une désoxyribonucléase acide extraite du thymus. Sont exposés ici surtout les résultats fournis par la réaction de Feulgen et notamment ceux de dosages cytophotométriques sur cellules individuelles et ceux de techniques histoautoradiographiques, basées sur l'incorporation de thymidine marquée au tritium.

Sous l'influence de fortes concentrations de l'un ou l'autre de ces enzymes, l'activité mitotique des fibroblastes est nulle ou faible; mais, quand une mitose se produit, elle évolue normalement. Le chondriome est profondément modifié et des chondriosomes sont transformés en "boules" "immobiles", devenant nombreuses.

Les mesures quantitatives d'ADN et les histoautoradiographies montrent notamment, pour les deux enzymes, que le pourcentage des valeurs dites "tétraploïdes" en ADN dans les noyaux intercinétiques, de même que celui des noyaux marqués sont nettement diminués par rapport aux témoins correspondants, bien que ces diminutions soient généralement moindres que celle de l'index mitotique. Une synthèse d'ADN peu fréquente a donc lieu, qui n'aboutit guère à des mitoses. Avec les deux enzymes, la teneur moyenne en ADN des noyaux en repos intercinétique (valeur diploïde) n'est pas abaissée, ce qui souligne sa constance dans la cellule vivante malgré l'activité des enzymes ajoutés aux cultures.

Une importante différence se manifeste entre les deux enzymes en ce qui concerne le cytoplasme. En effet, avec la DNase acide (non avec la neutre), de nombreux chondriosomes modifiés donnent une nette réaction de Feulgen. La quantité d'ADN ainsi présente dans le cytoplasme peut atteindre approximativement les neuf-dixièmes de celle contenue dans le noyau (valeur diploïde). L'histoautoradiographie prouve que ces ADN ne proviennent pas du noyau. Une série de faits et d'arguments montrent donc que non seulement il y a *accumulation* d'ADN dans des chondriosomes modifiés mais aussi *synthèse* d'ADN dans le cytoplasme.

Avec d'autres de nos observations, ces recherches sont en faveur de notre hypothèse selon laquelle une *synthèse d'ADN*—ou de matériel intermédiaire—se produirait normalement *dans le cytoplasme*, du moins à certains moments. Celle-ci aurait lieu plus précisément au niveau de chondriosomes, avec passage ultérieur dans le noyau. Lors de conditions particulières amenant des perturbations du chondriome, ces ADN s'accumuleraient dans des chondriosomes modifiés et "immobilisés" où ils seraient alors aisément décelables.

## BIBLIOGRAPHIE

- BAECKELAND E., CHÈVREMONT-COMHAIRE S. et CHÈVREMONT M. (1957) *C.R. Acad. Sci., Paris* **245**, 2390.
- BAECKELAND E., CHÈVREMONT M. et CHÈVREMONT-COMHAIRE S. (1958) *C.R. Ass. Anat.* 45e réunion, 135.
- CHÈVREMONT M. (1959) Dans *Colloque sur les Antimitotiques* Montpellier, Ed. C.N.R.S., Paris. Sous presse.
- CHÈVREMONT M., BAECKELAND E. et CHÈVREMONT-COMHAIRE S. (1959a) *C.R. Acad. Sci., Paris* **249**, 1392.
- CHÈVREMONT M., BRACHET J. et FIRKET H. (1959b) Dans *Rapports du Trente-deuxième Congrès Français de Médecine* pp. 43-56. Masson, Paris.
- CHÈVREMONT M. et CHÈVREMONT-COMHAIRE S. (1953) *Arch. Biol.* **64**, 399.
- CHÈVREMONT M. et CHÈVREMONT-COMHAIRE S. (1957a) *C.R. Soc. Biol., Paris* **151**, 1621.
- CHÈVREMONT M. et CHÈVREMONT-COMHAIRE S. (1957b) *Quad. Anat. Prat., Napoli* Sér. **12**, 81.
- CHÈVREMONT M., CHÈVREMONT-COMHAIRE S. et BAECKELAND E. (1958a) *C.R. Acad. Sci., Paris* **247**, 2197.
- CHÈVREMONT M., CHÈVREMONT-COMHAIRE S. et BAECKELAND E. (1958b) *C.R. Ass. Anat.* 45e réunion, 294.
- CHÈVREMONT M., CHÈVREMONT-COMHAIRE S. et BAECKELAND E. (1959c) *Arch. Biol.* **70**, 811.
- CHÈVREMONT M., CHÈVREMONT-COMHAIRE S. et BAECKELAND E. (1959d) *Arch. Biol.* **70**, 833.
- FIRKET H. (1956) *Ann. Histochim.* **1**, 277.
- FIRKET H. (1958) *Arch. Biol.* **69**, 1.
- FREDERIC J. (1958) *Arch. Biol.* **69**, 168.
- FREDERICQ E. et OTH A. (1957) *Biochem. J.* **66**, 33.
- FREDERICQ E. OTH A. et DESREUX V. 1960 Ce colloque p. 3.
- ZAHN R. K., RAJWSKI K., KIEFFER R., KIEFFER G. G., EITEL L. et ZAHN G. (1959a) *Naturwissenschaften* **17**, 518.
- ZAHN R. K., MÜLLER H. K., MÜLLER S. et ZAHN G. (1959b) *Biochem. Z.* **331**, 518.

## DISCUSSION

D. PICARD: Les expériences remarquablement démonstratives du Professeur CHÈVREMONT et de ses collaborateurs donnent très opportunément une grande généralité à la présence de l'ADN dans le cytoplasme, dont nous savons maintenant qu'elle se voit chez l'unicellulaire, dans la cellule en culture *in vitro* et dans les cellules de vertébrés supérieurs (mammifères) *in vivo*. De ces observations sont en effet à rapprocher celles qui ont été faites plus récemment dans le laboratoire de ZEIGER, à Hambourg: la coloration vitale au rouge neutre ou à l'orange d'acridine détermine dans beaucoup de cellules l'accumulation de grains cytoplasmiques basophiles dont certains contiennent de l'ARN, d'autres de l'ADN, d'autres les deux acides nucléiques; cette observation est considérée comme le résultat soit d'une altération pathologique du métabolisme des acides nucléiques, soit comme la concentration granulaire d'un ADN cytoplasmique très dispersé pré-existent.

J. TURCHINI: A l'appui des belles observations de M. CHÈVREMONT et ses collaborateurs sur la présence d'ADN dans le cytoplasme de cellules en culture et des remarques de M. PICARD, je puis ajouter que, par la technique de Feulgen et par d'autres techniques, j'ai observé, il y a déjà quelques années, chez *Helix aspersa* L. la présence d'ADN dans le cytoplasme de divers éléments et en particulier des œufs; ce qui montre que les observations de M. CHÈVREMONT paraissent avoir une portée très générale.

R. WEGMANN: Nous pouvons également confirmer la découverte de M. CHÈVREMONT, puisqu'il y a deux ans nous avons aussi démontré par spectrographie infrarouge que des fractions mitochondriales et microsomiales de *foie de rats* intoxiqués par le chloroforme et par le tétrachlorure de carbone contenaient des bandes d'acide désoxyribonucléique, ce qui nous avait beaucoup surpris à ce moment. En fait, depuis, nous savons que, en dehors du noyau, seules les mitochondries peuvent contenir aussi de l'ADN et que sa présence dans les microsomes était due à une contamination. Depuis, il a aussi été établi que la composition même de l'ADN du noyau et des mitochondries est distincte et qu'il existe deux types au moins d'ADN, un type CT (cytosine-thymidine) et un type AG (adénine-guanine), qui se trouvent de manière bien séparée soit dans le noyau soit dans les mitochondries, de sorte qu'on peut affirmer que la synthèse des deux types d'ADN est due à des processus différents (cf. WEGMANN R. (1957) *Ann. Histochem.* 2, 57).

J. BRACHET: Je voudrais ajouter aux remarques de M. WEGMANN que de nombreux œufs contiennent un excédent important d'ADN cytoplasmiques. Les recherches les plus poussées jusqu'à présent à ce sujet sont celles de M. DURAND, à Paris; travaillant sur des oocytes de grillon, il a pu démontrer une incorporation cytoplasmique de thymidine et établir que l'ADN cytoplasmique a une composition en bases très différente de celui présent dans les noyaux chez la même espèce.

C. LIÉBECQ: Y a-t-il une relation quantitative entre l'apparition d'ADN cytoplasmique et l'absence de ces cellules dont les noyaux contiennent, en intercinèse, le double de la quantité normale d'ADN?

M. CHÈVREMONT: Nous ne pouvons pas dire qu'il existe une relation étroite entre l'apparition d'ADN cytoplasmique et la rareté des cellules à teneur

“tétraploïde” en ADN nucléaires; il y a cependant un certain “parallélisme” puisque nous observons, à la fois, des ADN cytoplasmiques avec incorporation de thymidine tritiée en même temps que diminution du pourcentage de fréquence des valeurs “tétraploïdes” par rapport aux témoins correspondants.

C. LIÉBECQ: Les altérations produites par l'addition de DNase au milieu de culture sont-elles irréversibles?

M. CHÈVREMONT: Les modifications observées dans des fibroblastes sous l'influence de la DNase acide sont aisément réversibles. Il suffit en effet d'éliminer l'enzyme du milieu de culture par un simple lavage au liquide isotonique ou de transplanter la culture en milieu neuf sans DNase; dès lors, la croissance redevient pratiquement normale et, après un certain temps, il n'est plus possible de mettre en évidence aucune des lésions cellulaires qui viennent d'être discutées. Rappelons, d'autre part, que des cultures traitées par la ribonucléase (RNase) ne peuvent reprendre un état normal que si, après élimination de l'enzyme, une certaine quantité d'acide ribonucléique, provenant même d'une espèce différente, est ajoutée au milieu de culture (CHÈVREMONT M., CHÈVREMONT-COMHAIRE S. et FIRKET H. (1956) *Arch. Biol.* **67**, 635). Enfin, nous avons signalé, dans ce rapport, que contrairement aux DNases, on peut avec la RNase déceler des signes visibles d'atteinte nucléaire. Ces deux faits traduisent une grande différence en ce qui concerne le mode d'action des DNases d'une part, de la RNase d'autre part.

H. FIRKET: Dans le cas de cellules de vertébrés (voir aussi Discussion du Rapport du Dr. PLAUT), y a-t-il des signes d'un balancement, d'une alternance entre la synthèse de l'ADN dans le cytoplasme et celle qui a lieu dans le noyau. M. CHÈVREMONT a montré des cellules dont le cytoplasme avait incorporé de la thymidine et le noyau pas; mais, au moins dans une des images, il y eu synthèse de part et d'autre. Statistiquement, dans les cultures traitées à la DNase, les quelques cellules qui synthétisent l'ADN dans leur noyau montrent-elles moins d'enclaves ADN positives et d'incorporation de thymidine dans leur cytoplasme que les autres?

M. CHÈVREMONT: Les rares cellules qui ont réalisé une synthèse préprophasique d'ADN et dont le noyau est par conséquent marqué présentent une radioactivité cytoplasmique comparable à celles qui n'ont pas de nouveaux ADN dans leur noyau. De même, du point de vue cytochimique, le matériel Feulgen positif dans le cytoplasme, c'est-à-dire accumulé au niveau des mitochondries modifiées, n'est pas significativement plus ou moins abondant, que la teneur du noyau en ADN se rapproche soit de la valeur diploïde soit de la valeur tétraploïde. Il n'y a donc pas de signe évident d'alternance entre des synthèses d'ADN nucléaire et cytoplasmique.