

ÉTUDE D'UNE SUBSTANCE POLYPHOSPHORÉE, BASOPHILE ET MÉTACHROMATIQUE CHEZ LES LEVURES *

par

J. M. WIAME

Laboratoire de Physiologie cellulaire de l'Université de Bruxelles et Laboratoire de Microbiologie de l'Institut de Fermentation, Bruxelles (Belgique)

I. INTRODUCTION

On connaît depuis quelques années la signification chimique de la basophilie cytoplasmique (BRACHET¹, CASPERSSON²). Que ce soit dans la cellule végétale, animale ou fungique, l'affinité du cytoplasme pour les colorants basiques a pour cause principale la formation d'un complexe entre l'acide ribonucléique (A.R.N.) et le colorant. CASPERSSON, par la mesure de l'absorption dans l'ultra-violet, a pu apprécier la somme des acides thymo- et ribonucléique. En 1938 BRACHET³ émit l'hypothèse que la méthode de coloration de UNNA (vert de méthyle-pyronine) permet la distinction des deux acides, la pyronine colorant uniquement l'acide ribonucléique et le vert de méthyle, l'acide thymonucléique. Il en donna la preuve définitive^{4, 5, 6} en joignant à cette méthode de coloration le dosage du pentose et l'action de la ribonucléase découverte par JONES⁷ et par DUBOS^{8, 9}. L'intensité de la basophilie sensible à la ribonucléase est une fonction de la richesse en A.R.N. Celle-ci peut donc être appréciée ou même dosée dans les cas où des frottis quantitatifs peuvent être réalisés (BRACHET et JEENER¹⁰). La levure est un matériel de choix pour l'étude de la basophilie cytoplasmique. L'acide thymonucléique du noyau n'y est en effet présent qu'en très petite quantité (0.03%) alors que l'on peut y trouver de 0.5 à 2% d'A.R.N. ** La basophilie des levures a déjà été longuement discutée. On peut trouver dans CASPERSSON et BRANDT¹¹ et BRANDT¹² une vue d'ensemble sur cette question. Ces auteurs montrent l'identité des images obtenues par coloration des cellules par les colorants basiques ou par absorption de l'ultra-violet de 2.650 Å. Les levures au repos (levure pressée de boulangerie) contiennent en général des corpuscules ou agrégats de corpuscules très absorbants répartis le plus souvent autour de la vacuole. Cette même levure affamée par agitation pendant une nuit dans l'eau distillée à 25° perd une partie des substances absorbantes ; celles qui subsistent encore sont à l'état de corpuscules individualisés. L'ajoute de glucose à cette levure ne change pas fortement son aspect. Cependant l'ajoute simultanée de glucose et de sel ammoniacal qui permet aux cellules de se multiplier fait apparaître une augmentation de l'absorption et une solubilisation des corpuscules donnant à la cellule vue à l'U.V. un aspect homogène (CASPERSSON et BRANDT¹¹).

* Ce travail a fait l'objet de notes préliminaires, J. M. WIAME, *Compt. rend. soc. biol.*, 1944 et 1945 ; J. M. WIAME et P. H. LEFEBVRE, *Compt. rend. soc. biol.*, 1945.

** Le terme Acide zymonucléique (A.Z.N.) est employé pour désigner l'acide ribonucléique de la levure. Il est établi que dans la plupart des cas les acides ribonucléiques sont identiques (DAVIDSON et WEYMOUTH, *Biochem. J.*, 1943-44-45), GRÉGOIRE, 1945) l'A.R.N. du pancréas fait seule exception (LEVENE et JORPES, 1930).

En vue d'obtenir des variations plus considérables de la basophilie, JEENER et BRACHET¹³ ont repris le principe des cultures sans phosphate dû à VAN HERWERDEN¹⁴. Dans ces conditions et en répétant les cultures, la diminution de la basophilie est importante. *L'addition de phosphate à la solution nutritive fait alors apparaître une basophilie extrêmement forte.* Ces auteurs ont suivi le phénomène dans différentes conditions, en lui appliquant leur méthode de microdosage de la basophilie. Comme c'est ce travail qui nous a conduit à cette étude, nous en reprendrons quelques uns des points principaux.

Les variations importantes de la basophilie obtenues sont interprétées comme des variations de la teneur en acide nucléique. Ces variations sont considérables, de l'ordre de 500 à 1000% pour des temps de culture en milieu phosphaté, de 1 à 2 h. La croissance pendant ce temps n'est que de 20 à 25%. Parallèlement à ce phénomène, il y a une augmentation de la respiration atteignant 100% de la valeur initiale au bout de 60 minutes. Cette variation de la teneur en acide nucléique n'est pas modifiée, si dans le milieu de culture on supprime le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ce résultat est très important, étant donné le métabolisme azoté intense qu'implique une telle synthèse d'acide nucléique. Le phénomène de synthèse ne se produit pas en l'absence de substrat catabolisable. En anaérobiose, ou en présence d'un inhibiteur de la respiration (HCN), seul un substrat fermentescible comme le glucose permet la synthèse. En aérobiose, des substrats oxydables même non fermentescibles (alcool) la produisent également. Les inhibiteurs qui touchent simultanément la fermentation et la respiration empêchent la synthèse dans tous les cas. Tels sont : l'acide monoiodacétique M/100, la chloropicrine saturée, l'arséniate de Na M/100, le fluorure de Na *. On remarque donc que la synthèse nucléique se comporte comme les phosphorylations qui ont été décrites récemment et dont on a démontré qu'elles sont liées à l'intégrité du métabolisme. Les arguments en faveur de cette analogie sont discutés par JEENER et BRACHET¹⁵. Celle-ci ressort des travaux de LENNERSTRAND¹⁶ sur la synthèse de la cozymase, de LIPCHITZ, POTTER et ELVEHJEM¹⁷, OCHOA¹⁸, WESTENBRINK, WILLEBRANDS et KAMMINGA¹⁹, WESTENBRINK et VAN DORP²⁰, WESTENBRINK et VELDMAN²¹ sur la synthèse de la cocarboxylase, de ADLER, ELLIOT et ELLIOT²² sur celle de la codéhydrase II, de KALCKAR²³ sur la phosphorylation de la glycérine, de PULVER et VERZAR²⁴ sur le ferment jaune et enfin de OSTERN, BARANOWSKI et TERSZAKOWEC^{25, 26} sur la synthèse de l'acide adénylique et de l'acide adénosine triphosphorique à partir d'adénosine.

JEENER et BRACHET ont suivi, parallèlement à la synthèse d'acide nucléique, les variations des constituants de cet acide. Malgré la forte augmentation d'acide nucléique, la quantité de pentose présente dans les levures augmente à peine ; d'autre part, il se fait une augmentation de la teneur en purines, mais les auteurs n'ont pas établi si elle était proportionnelle à l'augmentation de la basophilie.

La basophilie cellulaire peut se manifester sous deux formes. La première consiste en granulations ou en plages sans éléments figurés ayant une teinte semblable ou peu différente de celle du colorant employé, c'est la *basophilie orthochromatique* et c'est à celle-ci que se rapportent la plupart des observations faites par les auteurs que nous avons cités. Cependant on sait que certains corpuscules cellulaires prennent avec des colorants tels que le bleu de toluidine, la thionine, etc. . . , une teinte différente de celle du colorant (en général les bleus donnent une teinte rougeâtre). Ce phénomène est appelé

* A condition qu'il soit introduit avant le substrat ; ceci est aisément explicable par les résultats de RUNNSTROM, GURNEZ et SPERBER, 1941.

métachromasie et les corpuscules qui ont cette propriété ont été appelés „corpuscules métachromatiques” (BABÉS²⁷). GUILLERMOND²⁸ montra leur présence dans les champignons, y compris les levures, dans les algues, les bactéries et les mastocytes des animaux. Depuis les travaux de LISON²⁹ on sait qu'il existe des substances, toutes esters sulfuriques d'oses, ayant la propriété de causer des virages métachromatiques très nets (vraie métachromasie). Jusqu'à présent la nature de la substance métachromatique de la levure est inconnue (BRANDT¹²).

2. MÉTHODE DE DOSAGE

a. Mesure de la basophilie

Les mesures ont été faites au moyen de la technique de BRACHET et JEENER¹⁰ légèrement modifiée. Nous nous servons de lames de microscopie sur lesquelles on a finement dépoli 3 cercles d'environ 2 cm de diamètre. Les lames sont nettoyées dans un mélange sulfochromique porté à 180°. Après nettoyage à l'eau courante, puis à l'eau distillée et séchage, on trace au moyen d'un crayon ordinaire un cercle de 1.5 cm de diamètre sur chaque surface dépolie. Dans chacun des cercles on répartit 50 ml d'une suspension de levure de richesse connue (env. 1 % de levure fraîche). Les lames sont placées 15 minutes sur une plaque métallique couvrant un bain-marie à l'ébullition. Les frottis sont ensuite plongés 10 min dans l'alcool éthylique à 95° et ensuite dans une solution aqueuse saturée de bleu de toluidine pendant 20 minutes. On rince avec un peu d'alcool pour enlever le gros du colorant en excès et on différencie par deux bains d'alcool à 95° respectivement de 10 et 50 minutes. On apprécie la quantité de colorant retenue par les

cellules en lavant la lame au moyen de HCl N et en recueillant la solution chlorhydrique de bleu de toluidine qui est amenée ensuite à 5 ml au moyen d'HCl N. La solution chlorhydrique de colorant est colorimétrée au photomètre de PULFRICH (cuve 10 mm, filtre S 61). Dans le cas où l'extinction dépasse 0.8, on dilue à un volume connu avec HCl N. L'erreur maxima des mesures est de $\pm 5\%$.

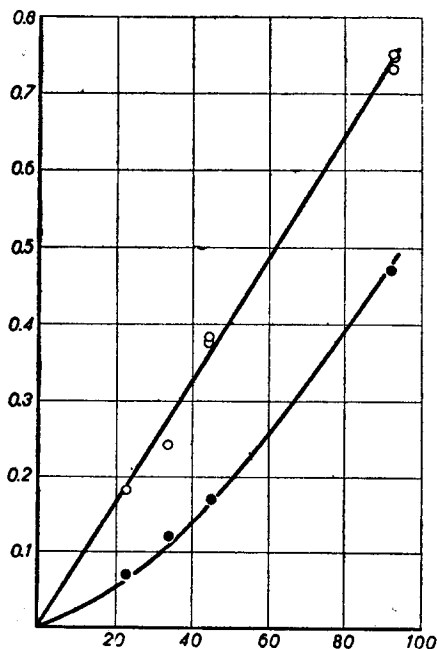


Fig. 1. Relation entre la quantité d'acide zymonucléique (en rg) et la quantité de bleu de toluidine fixée sur les frottis (en extinction au photomètre PULFRICH) abscisses : ac. zymonucléique ; ordonnées : extinction du photomètre.

Pour pouvoir comparer les valeurs de la *basophilie* dans les différentes expériences, nous avons rapporté celle-ci par le calcul à la quantité constante de 1 mg de levure sèche. Nous avons exprimé ce résultat par E^1 . Si E est la lecture expérimentale correspondant à la quantité a mg de levure sèche mise en oeuvre pour une lame (3 frottis), on aura : $E^1 = E \text{ mesuré} \cdot \frac{1}{a}$. On peut également exprimer la basophilie en acide zymonucléique. Pour cela il suffit de se rapporter à une courbe étalon obtenue au moyen de frottis préparés par mélange d'acide zymonucléique et de protéine (BRACHET et JEENER¹⁰). Une telle courbe étalon est donnée à la Fig. 1. Nous indiquons également sur cette figure les résultats obtenus au moyen de colorants de

deux marques. La différence de p_H des deux solutions de colorants explique la différence obtenue dans les deux essais. La Fig. 1, montre en effet que le p_H des solutions de colorant a une grande importance dans le résultat obtenu. Le colorant R.A.L. dont les solutions ont un p_H d'environ 6.5 a été choisi pour nos essais.

Connaissant la quantité de bleu de toluidine fixée sur une quantité déterminée d'acide zymonucléique, il était intéressant de connaître dans quel rapport se faisait la liaison bleu de toluidine — acide zymonucléique. Nous avons trouvé environ 0.8 molécule de colorant (commercial) fixé par atome de phosphore. L'acide thymonucléique donne des résultats semblables. Une phosphoprotéine, la caséine, fixe 1.6 molécule de colorant par atome de phosphore, soit une quantité environ double de celle de l'acide nucléique. Ceci correspond approximativement aux fonctions acides libres dans le cas de l'acide nucléique et de l'acide sérinephosphorique qui est le groupe prosthétique de la caséine. La correspondance obtenue, sensiblement stoechiométrique, est un nouvel argument en faveur d'une liaison chimique entre les protéines à groupes prosthétiques acides et les colorants basiques (bleu de toluidine, pyronine, etc. . .). Cette idée a déjà été défendue par KELLEY³⁰, BRACHET³, CASPERSSON et BRANDT¹¹; elle infirme la façon de voir de VON MÖLLENDORFF³¹ qui attribuait les différences de basophilie à des différences de densité des structures cellulaires.

Notons immédiatement que la quantité de phosphore contenue dans les phosphoprotéines est trop faible pour pouvoir intervenir dans la basophilie de la levure qui contiendrait une phosphoprotéine, la zymocaséine de THOMAS³²; l'existence de cette dernière a d'ailleurs été contestée par SARCIRON³³.

b. Dosage du pentose acido-soluble, du phosphore, de l'arginine et des purines.

Le pentose soluble a été dosé suivant BARRENSCHEEN et PEHAN³⁴ et le phosphore à l'état d'ion orthophosphorique par la micro-méthode de BERENBLUM et CHAIN³⁵. Nous avons toutefois préféré nous servir de fioles du type décrit à la Fig. 2 pour les lavages prévus dans cette méthode. La couche inférieure de liquide est recueillie dans le renflement au moyen d'une pipette effilée munie d'une poire en caoutchouc. Le col suffisamment haut permet une bonne agitation horizontale sans devoir boucher la fiole. L'ARGININE a été dosée suivant DUMAZERT et POGGI³⁶ en employant une solution d'hypobromite deux fois plus diluée en brome (0.9 ml/200 ml NaOH 10%) et en introduisant l'alcool (à 0°), qui stabilise la coloration, exactement 10 secondes après l'hypobromite.

Pour le dosage des purines, nous avons mis au point une méthode * basée sur une précipitation à l'argent ammoniacal (G. SCHMIDT^{27, 38}) suivie d'une précipitation au sulfite de cuivre (RAEKALLIO³⁹). Dans cette méthode nous avons recherché la possibilité de faire des dosages en séries (8 dosages simultanés) sur des quantités d'azote purique allant jusque 0.4 mg par essai. Cette méthode n'est utilisable que si la proportion des oxypurines est minime par rapport aux aminopurines, ces dernières seules étant précipitées quantitativement.

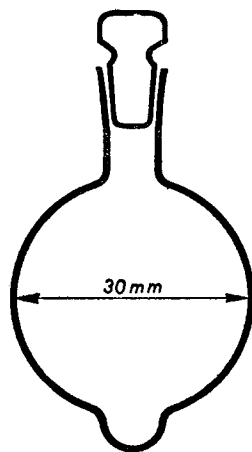


Fig. 2.

* Elle sera publiée prochainement.

3. EXPÉRIENCE FONDAMENTALE

L'expérience qui a servi de base à notre travail est celle que JEENER et BRACHET¹ ont décrite en 1943. On prépare une suspension de levure de boulangerie * à 1 g % dans un milieu composé de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 1.2 g 0/100, K_2SO_4 1 0/100, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.1 0/100, glucose 10 0/100 et amené à p_H 5.5 par le mélange succinate - acide succinique (2.5 0/100 d'acide succinique). Après 8 à 10 heures d'aération vigoureuse, on centrifuge la levure et on recommence l'opération 2 ou 3 fois. Au cours des 3 ou 4 aérations, la levure présente une légère croissance. Celle-ci est limitée par le manque de facteurs de croissance et d'ions PO_4 . L'utilisation de l'ammoniaque comme source d'azote entraîne une forte acidification qui est neutralisée par le tampon. La levure obtenue est nettement moins basophile que la levure initiale ; dans les cas les plus favorables seul le noyau apparaît nettement basophile dans un cytoplasme bleu clair. Le résultat est variable suivant l'échantillon initial de levure employée. La levure ainsi déchargée en substance basophile (abrév. levure déchargée) replacée dans le même milieu, mais en présence d'ions phosphate M/60 à M/30, synthétise une quantité de substance basophile, bien supérieure à celle que contenait la levure primitive. C'est l'étude de ce phénomène de synthèse que nous étudions dans ce travail.

En général le phénomène de synthèse de substance basophile (abrév. recharge) est plus sensible aux conditions extérieures que le métabolisme auquel il est cependant étroitement lié (voir p. 3 et 22). Le p_H optimum est p_H 5. Pour les p_H de 2.5, 6.3, 7.2, nous n'obtenons respectivement que 65, 82, 67% de la recharge optimale à p_H 5. Pour le p_H 8.3 la synthèse est nulle. Nous pouvons rapprocher ces constatations de celles de SPERBER⁴⁰ qui signale une inhibition considérable de la phosphorylation de l'aneurine dès que le p_H dépasse 6 (optimum vers p_H 3.5 à 4). La température a également une influence considérable. La recharge est nulle à 12° et augmente de vitesse jusque 30°. Le Q_{10} , variable avec l'échantillon, est toujours plus élevé que celui du métabolisme, par ex. 3.6 au lieu de 2.4 à 2.6 pour ce dernier.

Le concentration en phosphate influence fortement la vitesse de recharge ; dans les conditions de concentration en levure décrites précédemment, le maximum est atteint pour une concentration M/60, une concentration M/6 donne un résultat sensiblement identique.

4. RECHARGE ET COMPOSITION DE LA LEVURE

a. Phosphore total, pentose soluble, purine et arginine.

Au cours de la recharge, l'augmentation de la basophilie est considérable. En nous plaçant dans les conditions optimales, nous obtenons les résultats consignés dans la Fig. 3.

La richesse en phosphore augmente parallèlement à la basophilie. Alors que la basophilie passe de $E^1 = 0.23$ à 2.60, le P total passe de 0.44 à 3.64%. Si on suppose que cette augmentation est due à une variation de la teneur en acide zymonucléique (A.Z.N.) on est conduit à admettre une teneur de 47% d'acide nucléique (calculé sur subs. sèche). En se rapportant à la relation reliant la basophilie à la quantité d'A.Z.N. on obtient des valeurs moindres, mais cependant encore anormalement élevées et à peine concevables. Rappelons qu'une levure normale à une teneur en A.Z.N. de 4 à 8% (sur mat.

* „Levure royale” de la Nederlandsche Gist- en Spiritus-fabriek.

sèche). La courbe de la Fig. 3 a une allure sigmoïde. Cependant dans de nombreux cas la recharge était parfaitement linéaire. Au cours de la recharge, la teneur en pentose

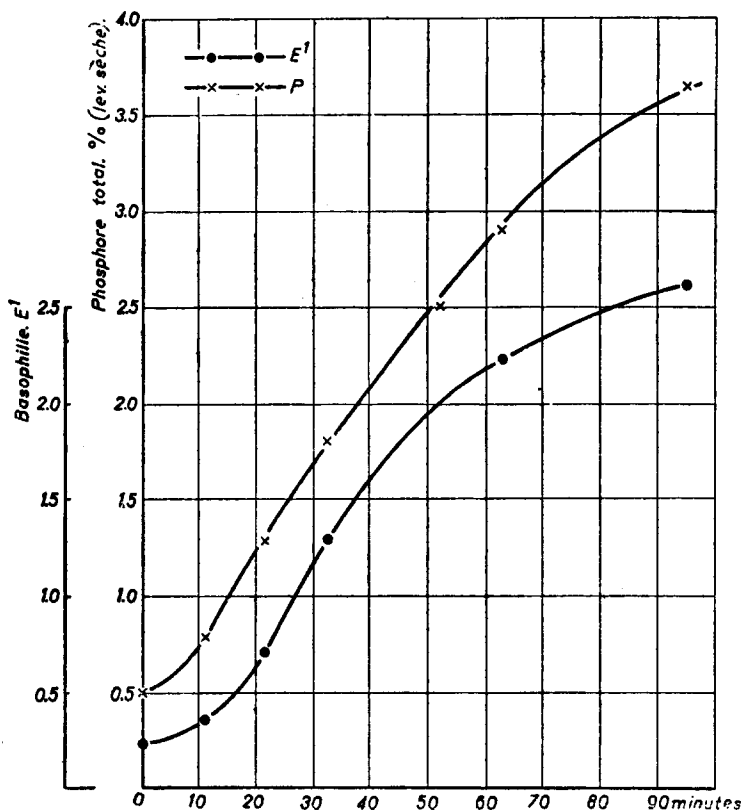


Fig. 3. Recharge en substance basophile et teneur en phosphor.

soluble (nucléotides, nucléosides, acide adénosine triphosphorique) n'augmente que de 10 à 20%. Dans le cas d'une recharge où la basophilie passait de 0.37 à 3.94, nous avons obtenu respectivement une teneur en purine passant de 0.16 à 0.22% correspondant à 0.74 et 0.97% d'A.Z.N. (% sur poids frais). On voit que l'augmentation de la teneur en purine (32%) est minime par rapport à celle de la basophilie et, de plus, que la valeur absolue de la teneur en purine ne peut expliquer une teneur en A.Z.N. correspondant à $47 \cdot \frac{1}{4} = 14\%$ (% lev. fraîche). Dans une seconde expérience semblable, l'augmentation était de 50%, entraînant les mêmes conclusions. Nous avons également déterminé que la teneur en arginine, un éventuel précurseur des purines, ne varie pas au cours de la recharge. La teneur en arginine de la levure reste $3.35\% \pm 0.15$ (% poids sec) au cours de la recharge.

Ces résultats permettent de rejeter l'idée que la variation de la basophilie est due dans ce cas à une augmentation massive de la teneur en acide zymonucléique. Ceci ne signifie évidemment pas qu'il en soit toujours de même, notamment dans les variations de la basophilie observées au cours des passages de l'état de repos à l'état de multiplication active (CASPERSSON⁴¹). Rappelons toutefois que dans ce dernier cas les variations sont de

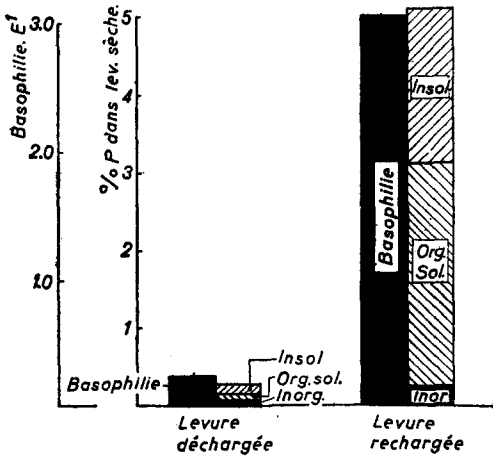
l'ordre de 100%. Le phénomène que nous étudions ici est d'une tout autre nature. Comme nous pouvons déjà le prévoir et comme cela sera confirmé par la suite, nous avons essentiellement à faire à une phosphorylation particulièrement intense.

b. Les différentes fractions du phosphore.

Au cours d'une recharge ayant fait passer la basophilie de $E^1 = 0.22$ à $E^1 = 3.05$ nous avons dosé les différentes fractions du phosphore. Les résultats sont donnés dans le Tableau I et la Fig. 4.

TABLEAU I

| Fraction dosée | Avant recharge | Après recharge |
|------------------|----------------------|----------------------|
| Basophilie E^1 | 0.22 | 3.05 |
| P inorganique | 0.049 % levure sèche | 0.226 % levure sèche |
| P acido-soluble | 0.135 % ibid. | 3.14 % ibid. |
| P total | 0.266 % „ | 5.13 % „ |



P soluble signifie ici, P extractible par l'acide trichloracétique à 10% pendant 20 min à la température du laboratoire, la levure après centrifugation étant encore reprise par l'acide trichloracétique pendant 5 min. Ce traitement suffit, comme nous avons pu le remarquer dans le cas des cellules normales; cependant, dans le cas d'une levure rechargée, nous avons constaté que des lavages successifs continuaient à entraîner du P. Dans le cas d'une levure ayant atteint une recharge de $E^1 = 3.04$ nous avons obtenu les résultats du Tableau II.

Fig. 4. Les différentes fractions du phosphore dans une levure déchargée et rechargée en substance basophile.

TABLEAU II

| Lavages à l'acide trichloracétique | Durée (min) | P extrait en % de la levure (poids sec) |
|------------------------------------|-------------|---|
| n° 1 | 20 | 1.66 |
| n° 2 | 5 | 0.45 |
| n° 3 | 90 | 0.72 |
| n° 4 | 20 | 0.40 |
| | | <hr/> 3.23 |

Le P total de cette levure était de 0.92 avant et de 5.4 après la recharge. Ceci nous indique que dans la levure rechargée le P acido-soluble n'a pas la signification de celui d'une levure normale. Le P continue à être libéré de façon continue, montrant ainsi que la substance basophile est, ou bien soluble dans l'acide trichloracétique ou bien décomposée par lui.

5. ESSAIS D'ISOLEMENT ET COMPOSITION DE LA SUBSTANCE BASOPHILE

La similitude de comportement de la substance basophile de la levure rechargée et de l'A.Z.N. nous ont engagé à essayer une méthode d'extraction de l'acide zymonucléique. Nous avons employé celle de JOHNSON et HARKINS ⁴².

50 g de levure rechargée sont mis en suspension dans 200 ml d'eau et maintenus à 0°; on y ajoute une solution de 16 g de NaOH dans 30 ml d'eau également à 0°. Le volume est alors porté à 300 ml et on laisse le mélange 1½ heure à 0°. Après ce temps la suspension est neutralisée au tournesol, par l'acide acétique. On centrifuge la suspension et on recueille un liquide légèrement orangé et opalescent. Après ajout d'alcool de façon à obtenir une concentration finale de 4 %, on filtre sur filtre SEITZ K5. Le liquide obtenu est parfaitement clair. Il contient de l'acide nucléique à l'état de nucléate. On ajoute à ce liquide de l'HCl concentré jusqu'à trouble net et persistant (ceci correspond à un virage franc vers le bleu, du papier rouge congo). Sans tarder, on ajoute alors 4/5 du volume d'alcool à 94°. Il se forme un trouble très prononcé qui se centrifuge généralement bien après ¼ heure à 0°. Dans le cas où le précipité ne se dépose pas convenablement par centrifugation, cela provient d'une acidification défectueuse. Le précipité obtenu est lavé trois fois à l'alcool et deux fois à l'éther. Il est ensuite séché dans le vide et conservé sur acide sulfurique. Le produit final est une poudre blanche dont l'aspect extérieur est identique à celui de l'acide zymonucléique.

Nous avons obtenu 250 mg de produit sec. Le dosage du phosphore sur ce produit nous a donné une valeur de 15.6%, alors que la teneur théorique en P de l'AZN est de 9.6%.

Pour faire une première purification, on dissout le produit obtenu dans l'eau à laquelle on ajoute de l'acétate de soude en quantité suffisante pour le dissoudre. La solution est de nouveau rendue acide par HCl concentré jusqu'à virage net du rouge congo; on ajoute par après 4/5 du volume d'alcool. Le précipité est recueilli, séché par l'alcool, puis par l'éther.

La teneur en phosphore de ce produit est alors de 17%.

Dans une seconde expérience nous avons obtenu 530 mg d'un produit contenant $15 \pm 0.5\%$ du P. Cette valeur n'a pas sensiblement changé par deux réprécipitations successives, quoiqu'on en recueille finalement que 150 mg.

On voit donc que malgré une certaine solubilité du produit dans le mélange HCl + alcool, la teneur en P ne varie que dans de faibles limites.

Signalons qu'un essai préliminaire nous a montré que le P de la substance se dissout en grande partie lorsqu'on le traite par l'acide trichloracétique. Cette étude sera reprise par la suite.

La substance ainsi isolée a la composition indiquée au Tableau III.

Nous avons également dosé le pentose, par comparaison avec l'acide zymonucléique, par la méthode semi-quantitative de BARRENSCHEEN et PEHAN. Nous avons trouvé un chiffre qui atteint environ la moitié de celui de l'A.Z.N.

TABLEAU III

| Groupement ou élément dosé | Substance basophile de levure rechargée % | A.z.N. (théorique) % |
|----------------------------|---|----------------------|
| P | 15 à 17 | 9.6 |
| P en groupe phosphoryle | 42 à 44 | 25.3 |
| N | 8 | 16.3 |
| Purine | 6.2 | 22 |
| N purique/N total | 40 | 66 |

6. PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

L'étude a principalement porté sur les propriétés chimiques des groupes phosphoryles de la substance isolée.

a. Hydrolyse standard suivant LOHMAN⁴³ dans HCl N à 100°.

15.5 mg de substance sont dissous dans 10 ml d'eau et ajoutés dans 90 ml d'HCl 1.1 N porté au préalable à 100°. On suit la libération d'acide orthophosphorique. Les résultats sont indiqués à la Fig. 5. Comme on le voit, après 7 minutes, 75 à 77% sont

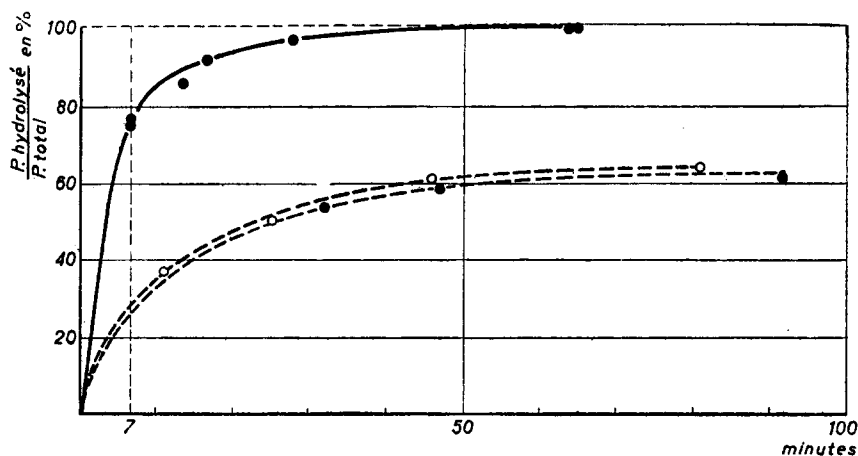


Fig. 5. Hydrolyse comparée dans HCl N à 100° de l'acide zymonucléique (.....) (2 essais) et de la substance basophile polyphosphorée (—)

hydrolysés. La vitesse d'hydrolyse est considérablement plus rapide que celle de l'A.Z.N.; de plus, l'hydrolyse est complète tandis qu'un essai semblable fait avec l'A.Z.N. n'a donné que 61 à 64% d'hydrolyse après un temps de 80 à 90 minutes.

b. Hydrolyse dans HCl N/10 à 100°.

On opère de façon identique avec HCl N/10. Les résultats sont indiqués au Tableau IV et à la Fig. 6.

Un essai semblable fait avec l'acide zymonucléique, voir Fig. 6, montre qu'après 300 min il n'y a que 57.5 % de phosphore total qui soit hydrolysé. La constante d'hy-

TABLEAU IV

| Temps min | % phosphore hydrolysé phosphore total | $K = \frac{1}{t} \log \frac{P. \text{ Total}}{P. \text{ total} - P. \text{ hydrol.}}$ |
|--------------|--|---|
| 0 | — | — |
| 5 | 32.6 | 0.0340 |
| 10 | 52.0 | 0.0318 |
| 26 | 79.5 | 0.0264 |
| 33 | 86.0 | 0.0258 |
| 47 | 91.0 | 0.0222 |
| 57 | 94.0 | 0.0221 |
| 86 | 100.0 | — |

drolyse étant dans ce cas, pour la portion moyenne de la courbe, de $K = 2.5 \cdot 10^{-3}$, soit environ 10 fois plus faible que celle de la substance étudiée dont la constante varie de 3.4 à $2.2 \cdot 10^{-2}$. Il est intéressant de constater que l'acide adénosine triphosphorique possède pour ces deux phosphores labiles une constante identique à celle de la substance basophile (moyenne de $2.57 \cdot 10^{-2}$). Nous avons également indiqué dans la Fig. 6 la

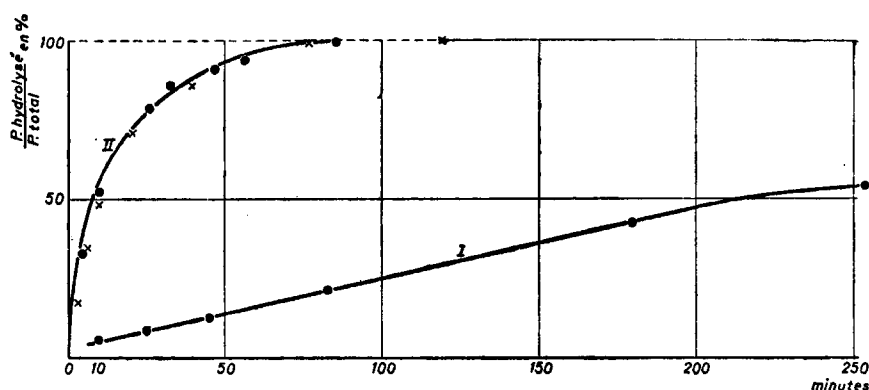


Fig. 6. Hydrolyse dans $HCl \frac{N}{10}$ à 100° de l'acide zymonuctéique (I), de l'acide adénosine triphosphorique (II \times — \times) (et de la substance basophile polyphosphorée (II \bullet — \bullet)).
Rem. Pour l'ac. adénosine triphosphorique l'ordonnée 100 signifie hydrolyse complète es 2 P. labiles.

courbe d'hydrolyse de l'acide adénosine triphosphorique suivant LOHMAN ⁴⁴ ; on voit qu'elle se superpose exactement à notre courbe d'hydrolyse. Remarquons toutefois que l'acide adénosine triphosphorique ne s'hydrolyse aisément que pour les $2/3$ de son phosphore.

7. PROPRIÉTÉS CYTOCHIMIQUES

Nous avons fait allusion à l'existence dans les cellules de levures normales, de corpuscules basophiles métachromatiques. Pour mettre ces corpuscules en évidence, il suffit de les colorer par un colorant basique tel que le bleu de toluidine. Les corpuscules métachromatiques apparaissent rougeâtres sur un fond bleu-violet. La technique de

MEYER⁴⁵ permet de les distinguer avec plus de netteté ; elle consiste à enlever la teinte bleu-violette (orthochromatique) par une solution d'acide sulfurique dilué. Dans ces conditions les corpuscules métachromatiques restent seuls colorés. Le bleu de méthylène employé par MEYER et la plupart des auteurs ne permet pas toujours de percevoir cette métachromasie. Elle varie fortement suivant les marques de bleu de méthylène. Mais ce que les auteurs constatent toujours, c'est l'existence de corpuscules dont la coloration ne s'efface pas par les acides dilués.

Depuis les travaux de LISON auxquels nous avons fait allusion, nous pouvons facilement nous rendre compte de l'aptitude plus ou moins grande qu'a un colorant de manifester le phénomène de la métachromasie. Il suffira de s'assurer que sa solution mélangée à une solution d'agar-agar présente nettement le phénomène. Parmi les colorants que nous avons essayés, le bleu de toluidine nous a donné les meilleurs résultats.

Combinant l'action de ce colorant avec une différenciation par l'acide chlorhydrique N/10 pendant 1 à 2 min, nous avons toujours pu mettre clairement en évidence les corpuscules métachromatiques. Dans la levure de boulangerie dont nous nous servons habituellement, leur fréquence est très variable : en général 1/3 des cellules contient quelques-uns de ces corpuscules. La quantité de colorant retenue par ces corpuscules est extrêmement faible par rapport à la quantité de colorant fixé par la simple méthode de coloration au bleu de toluidine avec différenciation à l'alcool. Elle est indosable par la méthode des frottis quantitatifs de BRACHET et JEENER, au moins dans les conditions où nous l'employons.

Nous avons constaté que des corpuscules métachromatiques apparaissent dans les cellules de levure chaque fois que nous faisons les recharges en substance basophile. Dans ces conditions, ils forment le gros de la basophilie totale de la levure ; après décoloration à l'HCl N/10 1 à 2 min, la cellule est encore intensément colorée, mais elle a perdu la teinte bleu-violette présente dans le cas d'une coloration ordinaire. Le phénomène est très visible microscopiquement et les frottis quantitatifs eux-mêmes ont à l'œil nu une teinte nettement différente de ceux préparés avec de la levure normale. En possession de la substance polyphosphorée isolée de la levure purifiée, nous pûmes réaliser des frottis artificiels exactement comme nous l'avions fait avec l'A.Z.N. Nous avons donc obtenu des frottis qui, sans exceptions, étaient métachromatiques.

Observations quantitatives. Pour pouvoir exprimer quantitativement la métachromasie nous avons comparé l'absorption de lumière par les frottis de levures normales et rechargée

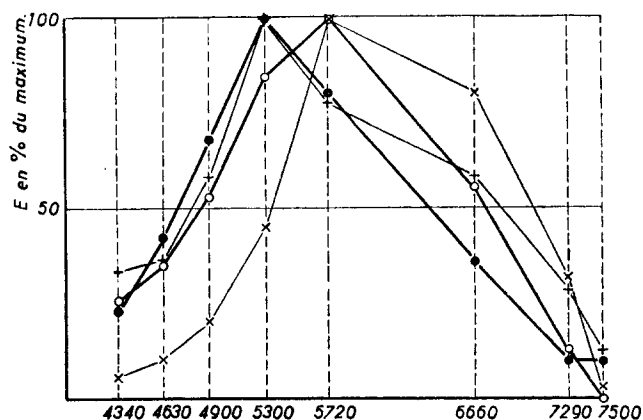


Fig. 7. Extinctions comparées de frottis de levures normales (●—○) de levures métachromatiques (●—●) et d'une solution de bleu de toluidine dans KH_2PO_4 avec (+—+) et sans (x—x) agar. Les longueurs d'ondes correspondent aux filtres employés dans le photomètre de Pulfrich.

pour les différents filtres du photomètre de PULFRICH. Pour réaliser les mesures, les frottis ont été transformés en préparation durable dans le baume de Canada : de cette façon, l'absorption de lumière par la partie rodée de la lame diminue et elle n'est plus due qu'au colorant fixé sur les cellules. Les préparations sont donc très transparentes. Nous avons placé 2 frottis superposés sur le trajet du faisceau lumineux de l'appareil. Le blanc était constitué par les mêmes préparations faites sur des frottis non colorés. Les résultats sont indiqués au Tableau V et à la Fig. 7.

TABLEAU V

| N° des filtres | Long. d'onde la moins absorbée en Å. | Extinction | | | |
|----------------|--------------------------------------|----------------|-------------|------------------|-------------|
| | | Levure normale | | Levure rechargée | |
| | | E | % de E max. | E | % de E max. |
| S. 75 | 7500 | 0 | 0 | 0.05 | 10 |
| S. 72 | 7290 | 0.05 | 13 | 0.05 | 10 |
| S. 66 | 6660 | 0.21 | 56 | 0.20 | 36 |
| S. 61 | 5720 | 0.37 | 100 | 0.45 | 81 |
| S. 53 | 5300 | 0.32 | 85 | 0.55 | 100 |
| S. 50 | 4940 | 0.20 | 53 | 0.38 | 69 |
| S. 47 | 4630 | 0.13 | 35 | 0.23 | 42 |
| S. 43 | 4340 | 0.10 | 26 | 0.13 | 23 |

A titre de comparaison, nous avons également donné à la Fig. 7 les résultats obtenus avec le bleu de toluidine en solution dans KH_2PO_4 M/6 additionné ou non d'agar-agar (0.5%). Les résultats comparés montrent que le déplacement de l'absorption est comparable dans les deux expériences. Nous avons également voulu vérifier si nous avions affaire à ce que LISON appelle une véritable métachromasie. Si elle est telle, elle doit se produire même lorsque le pH du colorant est acide. C'est ce que nous avons pu observer en descendant à pH 1. La métachromasie est même encore plus nette dans ces conditions. Ceci s'explique du fait que l'orthochromasie est fortement atténuée par l'acide (voir page 19). Un autre test que LISON propose est le chauffage des préparations. Comme pour la vraie métachromasie, nous avons obtenu la disparition de la métachromasie par chauffage de la préparation sur une plaque chauffante et sa réapparition lors du refroidissement.

Les solutions de la substance polyphosphorée * dans l'eau ne montrent pas comme l'agar le phénomène net de métachromasie. Jusqu'à présent nous n'avons pu le réaliser que sur des frottis, soit en mélangeant le composé à des protéines, soit lorsqu'il est présent dans des cellules de levure.

Rôle des groupements sulfuriques. Les recharges que nous avons effectuées se faisaient toujours en présence de K_2SO_4 . Il n'était donc pas exclu que les sulfates prennent part à la recharge et nous ne pouvions donc pas déterminer si des groupements sulfuriques n'étaient pas présents dans la substance métachromatique comme dans les autres cas de vraie métachromasie connue jusqu'à présent. Pour montrer rapidement si

* BANK et BUNGENBERG DE JONG ⁴⁶ signalent que l'A.Z.N. et l'acide thymonucléique en solution donnent le phénomène de métachromasie. Nous avons pu constater que sans étude spectrographique soignée, on ne pouvait déceler le phénomène, alors qu'il est frappant avec l'agar.

les ions SO_4 — intervenaient, nous avons fait une recharge avec et sans sulfate. Dans l'expérience avec sulfate, nous étions en présence de K_2SO_4 1⁰/₁₀₀ comme à l'habitude. Les résultats obtenus sont les suivants : au bout d'une recharge de 2 heures le E^1 passe de 0.72 à 1.76 en l'absence de sulfate ; en présence de celui-ci, il passe de 0.72 à 1.88. La recharge peut donc se produire sans sulfate et microscopiquement le degré de métachromasie apparaît identique. La faible différence observée peut facilement être attribuée soit à l'effet favorable du sulfate sur l'état général de la levure, ou simplement aux erreurs expérimentales.

Etude du complexe formé avec le bleu de toluidine.

Nous avons déjà signalé que le p_H des solutions de bleu de toluidine avait une grande importance dans la détermination quantitative de la basophilie lorsque celle-ci était due à l'A.Z.N.

Nous avons également montré dans le paragraphe précédent que la liaison du bleu de toluidine avec la substance métachromatique normale ou avec celle qui résulte de la recharge est beaucoup plus solide lors du traitement par les acides que la liaison bleu toluidine-A.Z.N.

Il était intéressant de chercher à donner une expression quantitative de cette propriété. Nous avons préparé des frottis de levure rechargée et normale ; ils ont été colorés par des solutions de bleu de toluidine amenées à différents p_H . Pour préparer ces solutions, nous prenons 50 ml de solution de bleu de toluidine à 1% ; les différents p_H sont obtenus par ajout de H_2SO_4 N/10 ou pour les p_H très bas, de H_2SO_4 N. Les résultats sont donnés au Tableau VI et à la Fig. 8.

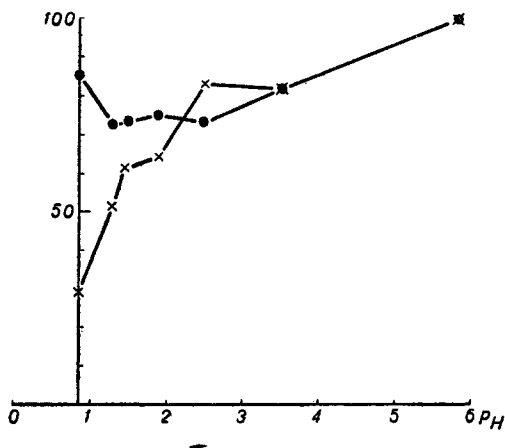


Fig. 8. Basophilie de la levure normale et rechargée en fonction du p_H de la solution de bleu de toluidine
 x — levure normale
 ● — levure rechargée
 en ordonnée Basophilie (la Basophilie à p_H 5.8 est prise 100 dans les deux cas).

TABLEAU VI

| pH | Levure rechargée | | Levure normale | |
|------|------------------|-----------|----------------|-----------|
| | E^1 | % du max. | E^1 | % du max. |
| 5.8 | 2.50 | 100 | 1.02 | 100 |
| 3.5 | 2.06 | 82 | 0.84 | 82 |
| 2.5 | 1.81 | 73 | 0.88 | 83 |
| 1.9 | 1.89 | 75 | 0.65 | 64 |
| 1.45 | 1.44 | 73 | 0.62 | 61 |
| 1.30 | 1.80 | 72 | 0.52 | 51 |
| 0.85 | 2.12 | 85 | 0.28 | 29 |

Les résultats montrent très nettement la différence de comportement entre les deux complexes A.Z.N.—B.T. et substance métachromatique—B.T. Même pour des p_H aussi bas que 0.85 où il ne subsiste plus que 29% de la coloration due à l'acide zymonucléique, il reste encore 85% de la coloration due à la substance métachromatique. Ceci explique donc clairement le comportement des corpuscules métachromatiques dans la technique de différenciation par HCl N/10, que nous avons employée. Nous ne nous expliquons cependant pas l'augmentation de la basophilie qui se produit en passant de p_H 1.30 à 0.85. Il y a peut-être une décomposition de la substance métachromatique libérant un certain nombre de fonctions acides capables de capter une molécule de bleu de toluidine. D'une façon générale, il est aisé de comprendre le comportement du complexe substance métachromatique-B.T. En effet la substance polyphosphorée est certainement un acide plus fort que l'A.Z.N. Le même phénomène se produit pour les dérivés de l'acide adénylique et on sait que certaines fonctions acides de l'acide adénosine triphosphorique sont plus puissantes que celles de l'acide phosphorique libre.

Cette propriété pourrait éventuellement servir non seulement à la mise en évidence qualitative de la substance métachromatique, mais également à son dosage approximatif. Il suffirait de mesurer la quantité de bleu de toluidine qui reste fixée après action de HCl N/10, 1 à 2 min. Nous n'avons pas encore examiné cette question quantitativement.

Nous avons pu mettre en évidence la substance métachromatique dans la levure rechargée parce qu'elle s'y accumule en grande quantité et qu'on peut l'en extraire. Dans le cas où ce composé serait présent en petite quantité, sa détection serait beaucoup plus délicate. De toute façon pour pouvoir l'extraire, il faudra toujours une quantité relativement grande de levure. Par sa propriété d'être métachromatique, sa présence peut être décelée beaucoup plus facilement et sur quelques cellules par examen microscopique. C'est ainsi que nous avons pu montrer que dans les cas de recharge de levure normale, non épuisée au préalable on avait également formation de substance métachromatique malgré la faible augmentation de basophilie. Il en est de même dans les recharges exécutées après épuisement dans l'eau distillée. Nous ne pouvons pas affirmer cependant que toute l'augmentation de la basophilie que l'on observe résulte de la formation de la substance métachromatique.

Application aux bacilles de LÖFFLER, Corynebacterium diphtheriae.

C'est sur ces bactéries que BABÈS²⁷ a montré pour la première fois l'existence de corpuscules métachromatiques. La nature de ces corpuscules de même que celle des corpuscules de levure n'a jamais été éclaircie. Nous avons réalisé des frottis de *Corynebacterium diphtheriae*. Ceux-ci colorés par le bleu de toluidine et différenciés dans HCl N/10 1 à 2 min à température ordinaire montrent très nettement les corpuscules métachromatiques. Nous pensons que cette technique très simple pourrait être appliquée d'une façon courante à l'identification de ces bactéries. On a décrit un grand nombre de techniques destinées à mettre en évidence ces corpuscules ; elles sont en général plus longues et surtout moins certaines. La simple coloration au bleu de toluidine permet de distinguer les corpuscules métachromatiques, mais comme pour les levures, l'orthochromasie générale de la cellule empêche de les distinguer très aisément.

Nous voyons que les corpuscules métachromatiques de ces bactéries se comportent vis-à-vis des acides d'une façon identique à ceux des levures normales et à la métachromasie générale des levures rechargées. Nous ne pouvons pas affirmer l'identité des substances mises en jeu dans ces trois cas, elle est cependant assez vraisemblable.

8. SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE

JEENER et BRACHET ont déjà montré l'étroite dépendance existant entre le métabolisme et la recharge en substance basophile. Ils ont montré que celle-ci ne se produit qu'à la condition que le métabolisme oxydatif ou fermentatif soit intact. Une expérience préalable nous a montré que l'alcool éthylique ou le glucose à des concentrations supérieures à 0.25% permettaient de réaliser des synthèses de substance basophile indépendantes de la concentration en substrat. Cependant, si la concentration descend en dessous de cette valeur, le métabolisme varie également de même que la vitesse de synthèse. C'est dans ces conditions que nous nous sommes placé pour établir la relation quantitative liant la synthèse à la desmolyse.

La levure déchargée est mise en suspension dans un milieu ne contenant que les sels minéraux habituels (on élimine le succinate qui pourrait être légèrement métabolisé). La suspension contient 0.5% de levure (exprimé en levure sèche). 2 ml de cette suspension sont introduits dans la chambre principale d'une série de godets d'appareil de WARBURG. Dans le godet latéral on place 0.36 ml de phosphate M/6 à p_H 6 et 0.25 ml de solution d'alcool ou d'eau pure dans le cas du témoin. Le métabolisme ne peut donc être qu'oxydatif et on peut le suivre par la mesure de l'oxygène consommé en absorbant le CO_2 par 0.3 ml de KOH à 20% placé dans la cuvette centrale de chaque godet. Après un temps d'expérience de 40 min, on bloque l'évolution des recharges en plaçant les godets à 0° et on mesure la basophilie. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau VII.

TABLEAU VII

| Dose d'alcool | Respiration Dénivellation manométrique en mm | E^1 | E^1 finale — E^1 initiale |
|--------------------|--|-------|-------------------------------|
| Avant l'expérience | — | 0.24 | — |
| Sans substrat | 51 | 0.28 | 0.04 |
| 0.038 mg | 109 | 0.41 | 0.17 |
| 0.076 mg | 132 | 0.49 | 0.25 |
| 0.152 mg | 193 | 0.66 | 0.42 |
| 1.52 mg | 246 | 0.90 | 0.66 |

Comme le montre la Fig. 9, la quantité de substance basophile synthétisée croît linéairement avec la respiration. Cette relation linéaire montre la liaison étroite existant entre la desmolyse et la synthèse. La respiration endogène (sans substrat) peut à peine être utilisée pour la synthèse, elle est vraisemblablement d'une autre nature.

La synthèse se présente donc comme le résultat d'un couplage dont la réaction couplante serait une des réactions de la desmolyse. Il n'est donc pas exclu à priori d'arriver à inhiber la synthèse sans bloquer la desmolyse, l'inverse étant évidemment impossible. Jusqu'à présent nous n'y sommes pas parvenu. Les poisons que nous avons employés à diverses doses sont d'ailleurs reconnus comme des poisons de la desmolyse. C'est le cas de l'arséniate, de l'acide monoiodacétique etc. . . Dans le cas de l'acide monoiodacétique nous avons réalisé un empoisonnement à dose croissante. La suspension de levure dans un tampon à p_H 5 est additionnée de différentes doses d'acide monoioda-

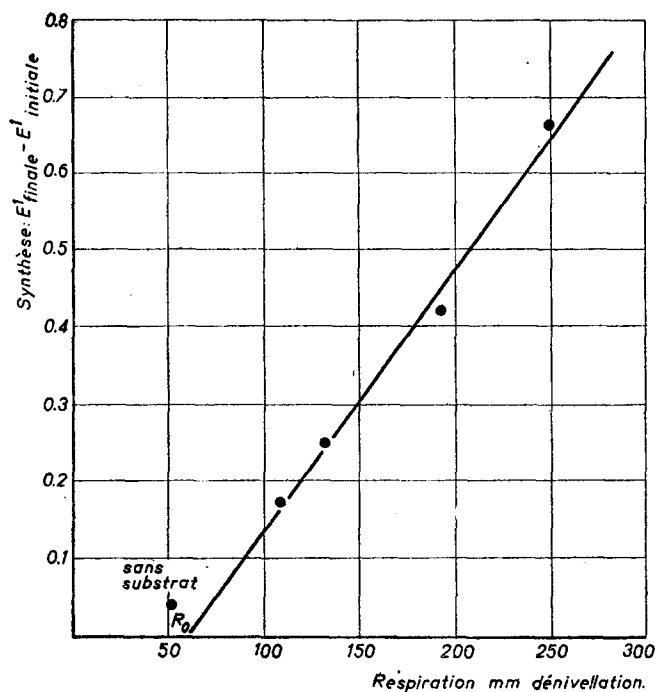


Fig. 9. Relation entre la respiration et la synthèse de substance basophile E^1 = extinction correspondant au bleu de toluidine fixé par 1 mg de levure.

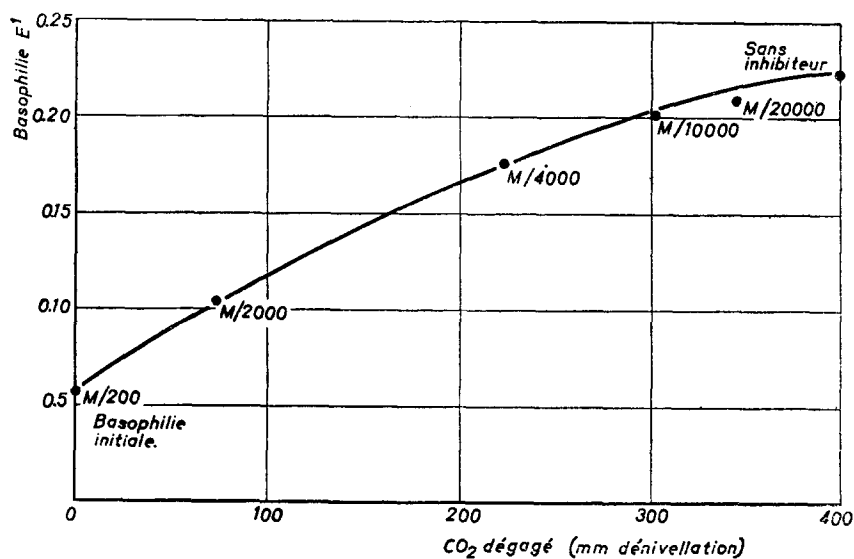


Fig. 10. Inhibition de la recharge et de la fermentation par l'acide monoiodoacétique. La concentration de l'inhibiteur est indiquée pour chacun des points expérimentaux.

cétique. On opère en appareil de WARBURG sur 1 ml de suspension de levure plus 1 ml de poison. Dans la corne latérale on place 0.3 ml de glucose à 20% dans KH_2PO_4 M/3. Après 70 min de fermentation à 28° on arrête la synthèse et on mesure la basophilie des levures. Les résultats sont indiqués à la Fig. 10. La phlorizine ne nous a donné aucune inhibition, ni de la desmolyse ni de la synthèse. Ceci est vraisemblablement dû au manque de pénétration de ce poison dans la cellule. L'acide barbiturique et le diéthylbarbiturate, employés à des p_H non inhibiteurs par eux-mêmes n'ont pas donné d'effet. L'acriflavine à 3‰ inhibe complètement la desmolyse. Signalons en passant qu'elle se fixe sur les cellules de façon semblable au bleu de toluidine. Les cellules très basophiles fixent des quantités d'acriflavine beaucoup plus importantes que les cellules normales. Ceci nous indique que ce poison s'attache aux groupes phosphoriques.

Il est intéressant de constater que HOTCHKISS⁴⁷ dans un travail récent a pu, dans le cas de bactéries sensibles à la gramicidine, inhiber la pénétration des phosphates par cet antibiotique sans que le métabolisme ne soit atteint.

9. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1°. Les cellules de levure du type *Sacch. cerevisiae* (levure de boulangerie) mises en suspension dans un milieu minéral riche en ions phosphate (M/60) et en présence d'un substrat oxydable ou fermentescible, peuvent synthétiser une substance basophile. Ce phénomène peut se présenter sous une forme particulièrement frappante lorsque les levures sont préalablement cultivées sur un milieu sans phosphate et placées ensuite en présence de cet ion (BRACHET et JEENER). Dans ces conditions la basophilie de la cellule peut augmenter de 500 à 1.500% en 1½ à 2 h.

2°. L'idée d'une liaison chimique entre le colorant et les constituants chimiques de la cellule résulte des travaux déjà cités (KELLEY³⁰, BRACHET³). Le fait que des molécules aussi différentes que l'acide thymonucléique, l'acide zymonucléique, la caséine se combinent au bleu de toluidine dans un rapport sensiblement stoechiométrique apporte un nouvel argument en faveur de cette idée. Les *variations de basophilie* doivent donc être interprétées comme des variations de teneur en substance basophile.

3°. Dans la levure normale (commerciale de boulangerie) la basophilie est due à l'acide zymonucléique, ce dont on peut s'apercevoir par action de la ribonucléase (BRACHET⁴⁸). Après l'action de cette enzyme, il ne subsiste que la basophilie nucléaire très peu importante vis-à-vis de la basophilie cytoplasmique.

Au cours de la synthèse en substance basophile que nous avons étudiée dans ce travail, le phosphore total augmente dans des proportions considérables alors que la teneur en purines, en pentoses et en pentoses acido-solubles ne varie que dans les proportions de la croissance. Ceci exclut la possibilité d'une synthèse considérable d'acide zymonucléique ou de nucléotide. Il s'agit donc d'une transformation massive d'orthophosphate en un composé phosphorylé basophile. Cependant la teneur de la levure en acide adénylique est trop faible pour qu'on puisse attribuer cette phosphorylation à la fixation de deux orthophosphates donnant naissance à l'acide adénosine triphosphorique.

L'extrait trichloracétique de la levure enrichie en substance basophile contient une grande partie du phosphore emmagasiné dans la cellule.

4°. Nous avons pu isoler la substance basophile synthétisée par la levure en utilisant une technique employée pour la préparation de l'acide zymonucléique. Le produit obtenu contient de 15 à 17% de phosphore au lieu de 9.6% pour l'acide zymonu-

cléique. Plusieurs reprecipitations ne font pas fortement varier cette teneur en phosphore. Le phosphore de la substance ainsi obtenue se distingue de celui de l'acide zymonucléique, en ce qu'il est entièrement hydrolysable et a une vitesse d'hydrolyse 10 fois plus grande. Ceci exclut également pour cette substance une nature adénosine triphosphorique. Cependant la vitesse d'hydrolyse est identique à celle de l'acide pyrophosphorique.

Nous devons signaler ici plusieurs travaux dont nous n'avons pris connaissance qu'après la fin de ces recherches. Tout d'abord T. MANN⁴⁹, en étudiant les diverses fractions du phosphore de l'*Aspergillus niger* a pu mettre en évidence dans l'extrait trichloracétique de cette moisissure de l'acide pyro-phosphorique et méta-phosphorique. Il est certain que cette observation est pleine d'intérêt en ce qui concerne la substance basophile dont nous nous occupons. Nous devons à l'amabilité de T. MANN de nous avoir signalé que KOSSEL⁵⁰ en 1893 et son élève ASCOLI⁵¹ en 1899, ainsi que MAC-FARLANE⁵² en 1936, avaient isolé de la levure un acide nucléique dont la richesse en phosphore était supérieure à celle de l'acide zymonucléique. Ils montrèrent que ce phosphore supplémentaire était de nature métaphosphorique. Il est à noter que l'acide métaphosphorique a une constante d'hydrolyse du même ordre de grandeur que celle de l'acide pyrophosphorique et de la substance basophile extraite des levures que nous étudions. Les auteurs que nous venons de citer retirent leur „acide zymonucléique métaphosphoré” ou „acide plasmique” * d'une levure normale, donc très différente de la nôtre. Il n'est pas exclu que nous assistions à un phénomène de même nature, mais dont l'intensité est fortement accrue. Les quantités que KOSSEL et ASCOLI retirent des levures sont en effet beaucoup moindres que celles que nous obtenons dans les levures rechargées. Les rapports entre ces substances sont actuellement à l'étude.

5°. Des frottis préparés à partir de la substance polyphosphorée basophile mélangée à des protéines manifestent vis-à-vis du bleu de toluidine le phénomène de métachromasie. Les levures rechargées ont la même propriété. La teinte des frottis apparaît nettement rougeâtre au lieu d'être bleu-violacée comme dans le cas de l'acide zymonucléique. On peut exprimer quantitativement ce phénomène en comparant le coefficient d'extinction pour différentes longueurs d'ondes, des frottis réalisés dans ces deux cas. Les modifications d'absorption sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec une substance métachromatique telle que l'agar. Quoique des substances diverses manifestent de la métachromasie, celle-ci est particulièrement prononcée pour les esters sulfuriques. Elle est discutée pour l'acide nucléique où en tous cas elle est faible. Pour la substance basophile polyphosphorée, elle est indiscutable et ce fait apporte un argument en faveur de la théorie de BANK et BUNGENBERG DE JONG⁵³ qui attribuent la métachromasie à la présence sur une grosse molécule de nombreuses charges négatives. Ceci cadre très bien avec la grande richesse en groupes acides de ce dérivé polyphosphoré.

6°. Nous avons constaté que le complexe de la substance polyphosphorée avec le bleu de toluidine est beaucoup plus difficilement dissocié par les acides que le complexe A.Z.N.-bleu de toluidine. Cette propriété nous permet d'enlever des cellules, la plus grande partie du bleu de toluidine lié à l'acide zymonucléique (coloration orthochromatique) laissant subsister presque entièrement la basophilie métachromatique. Ce fait est en accord avec l'ancienne technique de MEYER pour la mise en évidence des corpuscules métachromatiques des levures normales. Ceux-ci sont quantitativement peu importants et ne correspondent qu'à une fraction infime de la basophilie totale. Au contraire, dans

* Terme employé par KOSSEL.

les levures ayant synthétisé la substance polyphosphorée, les agrégats métachromatiques dont la cellule est véritablement bourrée, correspondent à une fraction très importante de la basophilie totale. La similitude de comportement de cette substance et des corpuscules métachromatiques des cellules normales, nous permet d'émettre l'hypothèse de leur parenté.

7^o. On peut assurer que les corpuscules métachromatiques ne sont pas simplement formés d'acide zymonucléique ordinaire, lequel est peu métachromatique. Ceci nous fait croire que les auteurs qui ont employé la technique de MEYER avec différenciation à l'acide sulfurique 1%, (DELA PORTE ^{54, 55}) n'ont vraisemblablement pas étudié l'acide zymonucléique, mais une autre substance. Ils ont pu montrer l'importance du phosphore dans l'apparition de ces corpuscules, ce qui ne doit pas nous surprendre. Cependant certains des résultats de DELA PORTE nous étonnent. L'auteur extrait l'acide zymonucléique en suspendant la levure dans une solution à 0.2% de bicarbonate de sodium pendant quelques heures, en agitant constamment. Les cellules, après ce traitement, sont encore vivantes et, selon l'auteur, l'acide zymonucléique passe en solution. Ceci nous semble invraisemblable, vu la grandeur de la molécule. Nous avons fait des dosages du pentose sortant des cellules dans ces conditions et nous n'avons retrouvé que 1/500 de l'acide nucléique total. Ce résultat peut facilement être dû à quelques cellules lésées au cours des opérations. La disparition des corpuscules métachromatiques signalée par DELA PORTE, ne correspond donc nullement à la disparition de l'acide zymonucléique, mais simplement à la disparition de la petite quantité de substance métachromatique. VENDRELY et SARCIRON ⁵⁶ arrivent également à la conclusion que la substance extraite par la méthode de Delaporte ne contient pas de urine, donc pas d'A.Z.N. La substance extraite serait l'haptène de la levure.

8^o. Nous avons vérifié que les corpuscules métachromatiques des bacilles de la diphtérie se comportent de façon semblable à ceux des levures normales et des levures chargées de substance polyphosphorée métachromatique. Rapprochons ce fait de celui observé par ARLOING et RICHARD ⁵⁷. Ils montrent que par culture dans un milieu riche en phosphore, on peut faire naître des corpuscules métachromatiques dans des bactéries qui normalement n'en forment pas (bacille pseudo-diphtérique). Ceci est un argument de plus en faveur de l'idée que chez les bactéries également les corpuscules métachromatiques sont des dérivés polyphosphorés.

9^o. La propriété de métachromasie est précieuse pour suivre la substance polyphosphorée dans les cellules. Ainsi, les cellules normales ou épuisées dans l'eau distillée se rechargent faiblement en présence de phosphate. Dans ce cas, il y a également formation de composé métachromatique. La recharge est donc due au moins en partie à la substance basophile polyphosphorée.

10^o. CASPERSSON, dans les travaux que nous avons signalés dans l'introduction, mesure la teneur des cellules en purines et pyrimidines, par leur absorption spécifique de l'ultra-violet. De cette façon, il montre pour les levures, des variations pouvant atteindre 100%. Nous ne rejetons pas l'idée que des modifications de la teneur en acide zymonucléique puissent apparaître au cours de la croissance active des levures. Dans nos expériences, nous nous sommes placés dans des conditions où la croissance est faible (25%) et nous avons d'ailleurs observé des variations de la teneur en purines atteignant 50%. Il ressort de notre travail que la mesure de la basophilie dans le cas des levures n'est pas toujours l'équivalent de la mesure de la teneur en acide zymonucléique. La basophilie ne mesure en somme que les protéines à groupe prosthétique

acide. En général cependant, la technique de BRACHET et JEENER est applicable si on prend soin de s'assurer au préalable de l'absence de dérivé polyphosphoré, par la technique cytochimique que nous proposons.

11⁰. La synthèse de la substance basophile est liée au métabolisme. En présence d'acide monoiodacétique, il n'y a pas de recharge et le phosphore total de la levure n'augmente pas. De plus, la relation qui lie la synthèse de la substance basophile à la respiration est linéaire. Cette relation montre également par extrapolation, que pour une valeur R^0 de la respiration (Fig. 9) on n'a pas de synthèse. Ceci correspond au fait que la respiration endogène (sans substrat), quoique notable, est très peu utilisable pour la synthèse, sans doute parce qu'elle est d'autre nature que la respiration avec substrat. Dans un même ordre d'idée, BOREI ⁵⁸ a distingué une respiration endogène stable d'une respiration endogène passagère (qui ne dure que 2 à 3 heures après la fabrication de la levure). La respiration endogène dont nous parlons dans nos expériences est du type stable.

L'emploi de poisons tels que l'acide monoiodacétique, montre également que la synthèse et le métabolisme sont inhibés de façon fort semblable. Il n'est cependant pas exclu de pouvoir trouver un inhibiteur de la synthèse qui n'agisse pas sur la respiration ou la fermentation. Les deux mécanismes sont liés, mais c'est la desmolyse qui est la réaction primaire et limitante, la synthèse étant le résultat du couplage avec la précédente et n'ayant pas nécessairement sur elle une action réciproque.

12⁰. Le dérivé polyphosphoré mis en évidence dans la levure rechargée, se présente comme une anomalie, au moins par la forte proportion qui peut y apparaître. Cependant l'existence des corpuscules métachromatiques en très petite quantité dans les levures normales, dans certains champignons, algues et bactéries, nous permet d'espérer qu'on trouvera une signification biologique générale à ce constituant cellulaire. Nous ne pouvons faire à ce sujet que des hypothèses.

Vu les analogies que ce dérivé polyphosphoré a avec l'acide adénosine triphosphorique, on peut notamment songer à l'impliquer dans des mécanismes de transport d'énergie semblables à ceux qui font jouer à l'acide adénosine triphosphorique un rôle central dans le métabolisme cellulaire (LYNEN ⁵⁹, KALCKAR ⁶⁰).

RÉSUMÉ

1. On étudie les fortes variations de la basophilie qui apparaissent dans la levure, préalablement appauvrie en phosphore et placée ensuite en présence d'ions phosphate.
2. Les variations de la basophilie sont comparées aux variations de la composition de la levure en phosphore, purines et pentoses acidosolubles.
3. L'extraction d'une substance riche en phosphore et basophile différente de l'acide zymonucléique permet d'expliquer les résultats obtenus.
4. Les propriétés chimiques et la composition de la substance basophile sont étudiées.
5. Les levures fortement basophiles ainsi que la substance extraite manifestent à un haut degré le phénomène de métachromasie. Ceci permet la mise en évidence cytochimique de cette substance.
6. L'étude quantitative de la synthèse de la substance basophile et de la desmolyse permet de saisir le couplage des deux réactions.

SUMMARY

1. A study has been made of the considerable variations in basophily which occur in phosphorus exhausted yeast cells, afterwards brought again into the presence of phosphate ions.

2. These changes in basophily have been compared with changes in the phosphorus, purine, and acido-soluble pentose content of the yeast cells.
3. The extraction of a phosphorus-rich basophilic substance, different from zymonucleic acid, explains the results obtained.
4. The chemical properties and the composition of the basophilic substance have been studied.
5. Strongly basophilic yeast cells, as well as the substance extracted, show an intense metachromasy. This property makes possible the cytochemical detection of the substance.
6. A quantitative study of the synthesis and desmolysis of the basophilic substance indicates that the two reactions are coupled.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die starken Basophilie-Veränderungen, die in Hefe vorkommen, welche erst phosphorarm gemacht und dann in Berührung mit Phosphat-Ionen gebracht worden ist, werden hier untersucht.
2. Die Basophilieveränderungen werden mit den Veränderungen des Gehalts der Hefe an Phosphor, Purinen und säurelöslichen Pentosen verglichen.
3. Die Extraktion einer phosphorreichen und basophilen Substanz, die von Zymonucleinsäure verschieden ist, erklärt die erhaltenen Resultate.
4. Die chemischen Eigenschaften und die Zusammensetzung der basophilen Substanz werden untersucht.
5. Stark basophile Hefen sowie die extrahierte Substanz zeigen sehr starke Metachromasie. Diese Eigenschaft ermöglicht den cytochemischen Nachweis dieser Substanz.
6. Die quantitative Untersuchung der Synthese der basophilen Substanz und der Desmolyse zeigt an, dass beide Reaktionen miteinander gekoppelt sind.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. BRACHET, *Arch. biol.*, **44** (1933) 519.
- 2 T. CASPERSSON, *Skand. Arch. Physiol. Suppl.*, **8** (1936) 73.
- 3 J. BRACHET, *Bull. classe sc. Acad. roy. Belg.*, **24** (1938) 499.
- 4 J. BRACHET, *Compt. rend. soc. biol.*, **133** (1940) 88.
- 5 J. BRACHET, *Enzymologia*, **10** (1941) 87.
- 6 J. BRACHET, *Arch. biol.*, **53** (1941) 207.
- 7 W. JONES, *J. Physiol.*, **52** (1920) 203.
- 8 R. J. DUBOS ET R. H. THOMPSON, *J. Biol. Chem.*, **124** (1938) 501.
- 9 R. J. DUBOS ET C. M. MCLEOD, *J. Exp. Med.*, **67** (1938) 791.
- 10 J. BRACHET ET R. JEENER, *Acta Biol. Belg.*, **2** (1942) 268.
- 11 T. CASPERSSON ET K. M. BRANDT, *Protoplasma*, **35** (1941) 507.
- 12 K. M. BRANDT, *Protoplasma*, **36** (1941) 77.
- 13 R. JEENER ET J. BRACHET, *Bull. classe Sci., Acad. roy. Belg.*, **29** (1943) 476.
- 14 M. A. VAN HERWERDEN, *Proc. Koninkl. Akad. Wetenschappen Amsterdam*, **20** (1917) 1.
- 15 R. JEENER ET J. BRACHET, *Acta Biol. Belg.*, **1** (1941) 47.
- 16 A. LENNERSTRAND, *Arkiv Kemi, Mineral. geol.*, **A 14** Nr. 16 (1941) 1.
- 17 M. A. LIPSCHITZ, VAN RENSSLAER POTTER ET C. A. ELVEHJEM, *Biochem. J.*, **32** (1938) 474.
- 18 S. OCHOA, *Biochem. J.*, **33** (1939) 1262.
- 19 H. G. K. WESTENBRINK, A. F. WILLEBRANDS ET CHR. E. KAMMINGA, *Enzymologia*, **9** (1940) 228.
- 20 H. G. K. WESTENBRINK ET D. A. VAN DORP, *Enzymologia*, **10** (1942) 212.
- 21 H. G. K. WESTENBRINK ET H. VELDMAN, *Enzymologia*, **10** (1942) 255.
- 22 E. ADLER, S. ELLIOT ET L. ELLIOT, *Enzymologia*, **8** (1940) 80.
- 23 H. M. KALCKAR, *Biochem. J.*, **33** (1939) 631.
- 24 R. PULVER ET F. VERZAR, *Enzymologia*, **6** (1939) 333.
- 25 P. OSTERN ET J. TERSZAKOWEC, *M. physiol. Chem.*, **250** (1937) 155.
- 26 P. OSTERN, T. BARANOWSKI ET J. TERSZAKOWEC, *Z. physiol. Chem.*, **251** (1938) 258.
- 27 V. BABES, *Z. Hyg.*, **20** (1889) 412.
- 28 A. GUILLIERWOND, *Traité de cytologie végétale*, Paris 1933.
- 29 L. LISON, *Histochimie animale*, Paris 1936.

- ³⁰ E. G. KELLEY, *J. Biol. Chem.*, **127** (1939) 35.
³¹ W. VON MOLLENDORFF ET M. VON MOLLENDORFF, *Ergeb. Anat.*, **25** (1924) 1.
³² P. THOMAS, *Ann. inst. Pasteur*, **35** (1921) 43.
³³ R. SARCIRON, *Ann. inst. Pasteur*, **71** (1945) 201.
³⁴ H. K. BARRENSCHEEN ET A. PEHAM, *Z. physiol. Chem.*, **272** (1942) 81.
³⁵ I. BERENBLUM ET E. CHAIN, *Biochem. J.*, **32** (1938) 295.
³⁶ CH. DUMAZERT ET R. POGGI, *Bull. soc. chim. biol.*, **21** (1939) 1381.
³⁷ G. SCHMIDT ET E. ENGEL, *Z. physiol. Chem.*, **208** (1932) 225.
³⁸ G. SCHMIDT, *Z. physiol. Chem.*, **219** (1933) 14.
³⁹ T. RAEKALLIO, *Skand. Ark. Physiol.*, **81** (1939) 1.
⁴⁰ E. SPERBER, *Biochem. Z.*, **313** (1942) 62.
⁴¹ T. CASPERSSON, *Naturwissenschaften*, **29** (1941) 33.
⁴² B. JOHNSON ET H. HARKINS, *J. Am. Chem. Soc.*, **51** (1929) 1779.
⁴³ K. LOHMANN, *Biochem. Z.*, **102** (1928) 466.
⁴⁴ K. LOHMANN, *Biochem. Z.*, **254** (1932) 381.
⁴⁵ A. MEYER, *Botan. Z.*, **62** (1904) 113.
⁴⁶ O. BANK ET H. G. BUNGENBERG DE JONG, *Protoplasma*, **32** (1939) 489.
⁴⁷ R. D. HOTCHKISS, *Advances in Enzymology*, **4** (1944) 153.
⁴⁸ J. BRACHET, *Bull. classe Sci., Acad. roy. Belg.*, **29** (1943) 707.
⁴⁹ T. MANN, *Biochem. J.*, **38** (1944) 339 et 345.
⁵⁰ A. KOSSSEL, *Arch. Anat. Physiol., Physiol. Abt.*, (1893) 160.
⁵¹ A. ASCOLI, *Z. physiol. Chem.*, **28** (1899) 426.
⁵² M. G. MACFARLANE, *Biochem. J.*, **30** (1936) 1369.
⁵³ O. BANK ET H. G. BUNGENBERG DE JONG, *Protoplasma*, **32** (1939) 489.
⁵⁴ B. DELAPORTE ET N. ROUKELMANN, *Compt. rend., Ac. Sc. Paris*, **206** (1938) 1399.
⁵⁵ B. DELAPORTE, *Rev. gen. botan.*, **51** (1939) 449.
⁵⁶ R. VENDRELY ET R. SARCIRON, *Ann. inst. Pasteur*, **71** (1945) 619.
⁵⁷ F. ARLOING ET G. RICHARD, *Rev. gen. botan.*, **33** (1921) 88.
⁵⁸ H. BOREI, *Naturwissenschaften*, **30** (1942) 260.
⁵⁹ F. LYNEN, *Naturwissenschaften*, **30** (1942) 398.
⁶⁰ H. M. KALCKAR, *Biolog. Rev.*, **118** (1942) 619.

Je remercie profondément Messieurs les Professeurs J. BRACHET et R. JEENER pour les conseils qu' ils n' ont cessé de me donner au cours de ce travail.

Reçu le 26 mars 1946.