

## RECHERCHES SUR LE RÔLE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DES NOYAUX

par

J. BRACHET ET R. JEENER

*Laboratoires de Morphologie animale et de Physiologie animale, Université libre de Bruxelles (Belgique)*

### I. INTRODUCTION

Les nombreux auteurs qui, à la suite de GOMORI, ont recherché la localisation de la phosphatase alcaline dans les tissus les plus variés, ont tous insisté sur le fait que la réaction est surtout intense dans les noyaux (GOMORI, BOURNE, WILLMER, MOOG, KRUGELIS, DANIELLI ET CATCHESIDE, DEMPSEY ET WISLOCKI, etc.). En effet, à part quelques cas particuliers où l'enzyme se trouve en abondance dans le cytoplasme, tels que la zone corticale du rein et la muqueuse intestinale, ce sont la chromatine et le nucléole qui se colorent le plus fortement. Ces constatations sont du reste en parfait accord avec les résultats de DOUNCE sur les noyaux isolés du foie de Mammifères: des dosages quantitatifs lui ont, en effet, montré que la phosphatase alcaline est le seul enzyme étudié jusque maintenant qui se trouve en plus grandes quantités dans le noyau que dans le cytoplasme. A vrai dire, l'un de nous (J. B.) n'a pas observé d'accumulation de la phosphatase alcaline dans la vésicule germinative isolée des oocytes de grenouille, par rapport au cytoplasme: mais ce résultat négatif n'est pas fait pour nous surprendre, puisqu'il s'agit d'un noyau où le suc nucléaire l'emporte de beaucoup sur la chromatine au point de vue quantitatif.

Le rôle de la phosphatase alcaline dans les noyaux n'apparaît pas encore clairement. WILLMER a signalé que dans les cellules cultivées *in vitro* la réaction serait beaucoup plus intense dans les chromosomes que dans la chromatine des noyaux au repos: pareille observation suggère une intervention de la phosphatase alcaline dans la réduplication des chromosomes et, plus particulièrement, dans la synthèse de leur acide thymonucléique. Mais les constatations de WILLMER ne paraissent pas avoir une portée générale, car MOOG n'a pu retrouver le fait dans le cas de l'embryon de poulet; en outre, dans les œufs d'Amphibiens en voie de développement, la réaction de GOMORI demeure très faible pendant toute la segmentation et la gastrulation, tant dans les noyaux au repos que dans les chromosomes: l'embryon est cependant à ce moment le siège d'une rapide synthèse d'acide thymonucléique (BRACHET).

On peut néanmoins présumer, en raison de la localisation stricte de la phosphatase alcaline des noyaux au niveau de la chromatine et des nucléoles, l'existence d'un lien entre cet enzyme et les composés phosphorés les plus importants du noyau cellulaire, les acides nucléiques; en particulier, on peut se demander si la phosphatase alcaline nucléaire n'interviendrait pas dans le métabolisme des acides nucléiques en contrôlant la vitesse du renouvellement (turnover rate) du phosphore de l'acide thymonucléique. On sait, en effet, par les travaux de HEVESY ET OTTESEN et de HAMMARSTEN ET HEVESY, que la

vitesse du renouvellement du phosphore de l'acide thymonucléique, mesurée à l'aide de P radioactif, varie fortement d'un organe à l'autre chez le rat: les chiffres en % donnés par les auteurs scandinaves pour le remplacement quotidien du P de l'acide thymonucléique sont les suivants: muqueuse intestinale 15, rate 5.8, testicule 2.6, muscle 1.9, rein et cerveau 0.6.

Ces différences sont suffisamment élevées pour qu'on puisse espérer relever des variations nettes dans l'intensité de la réaction de la phosphate alcaline dans les noyaux des différents organes étudiés par HEVESY ET OTTESEN: c'est ce que nous avons essayé de faire.

## II. MÉTHODES ET MATÉRIEL

Nous avons utilisé la méthode désormais classique de GOMORI, qu'il est inutile de décrire en détail ici: le seul substrat employé était le glycérophosphate de Na à 2% dans un tampon au véronal. Le précipité de phosphate de calcium était rendu visible par des traitements successifs des coupes par le nitrate de cobalt et le sulfure d'ammonium. Les essais de contrôle usuels, en l'absence de substrat, ont été exécutés chaque fois. En outre, nous avons vérifié que la réaction devient négative, en raison de l'inactivation de l'enzyme, lorsque les préparations sont chauffées à sec pendant 10 min à 100° C.

Afin de pouvoir comparer dans de bonnes conditions l'intensité de la réaction dans les divers organes étudiés, deux coupes de chacun de ceux-ci étaient placées côté à côté sur le même porte-objet; les observations ont porté sur l'intestin, la rate, le testicule, le foie, le rein, le cerveau et le muscle strié de souris; tous ces organes, provenant des mêmes animaux, étaient donc traités simultanément depuis la fixation dans l'alcool jusqu'à l'examen final.

La plupart des cytologistes qui se sont servis de la méthode de GOMORI pour la détection de la phosphatase alcaline dans divers tissus ont eu recours à des temps d'incubation prolongés, de l'ordre de 12 à 24 heures, afin d'obtenir des colorations extrêmement intenses; une telle manière de faire n'était évidemment pas à conseiller dans le cas présent où nous cherchions à comparer de façon semi-quantitative la teneur en enzyme des noyaux dans les différents organes: il était en effet à prévoir que l'intensité de la réaction deviendrait uniforme dans tous les noyaux pour les longues périodes d'incubation. Celles-ci variaient donc dans nos expériences de 15 min à 20 heures.

## III. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Ainsi qu'on pouvait le penser, les noyaux de tous les organes étudiés noircissent intensément lorsque la réaction de GOMORI est effectuée après 15 à 20 heures d'incubation avec le substrat; par contre, des différences considérables s'observent lorsque la durée de l'incubation est limitée de 15 min à 3 heures. C'est ainsi qu'après immersion dans le glycérophosphate pendant un quart d'heure, seuls les noyaux de la muqueuse intestinale — surtout au niveau des cryptes de Lieberkühn — fournissent une réaction nettement positive; dans tous les autres organes (rate, testicule, rein, cerveau et muscle), l'intensité de la réaction est la même que dans les contrôles.

Mais c'est après 2 à 3 heures d'incubation que les résultats les plus nets s'obtiennent: ainsi qu'on peut le voir sur les microphotographies de la Fig. 1, les noyaux des cellules

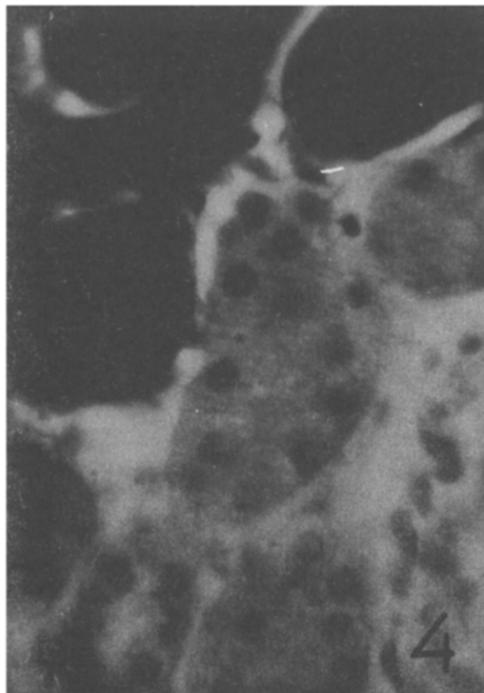
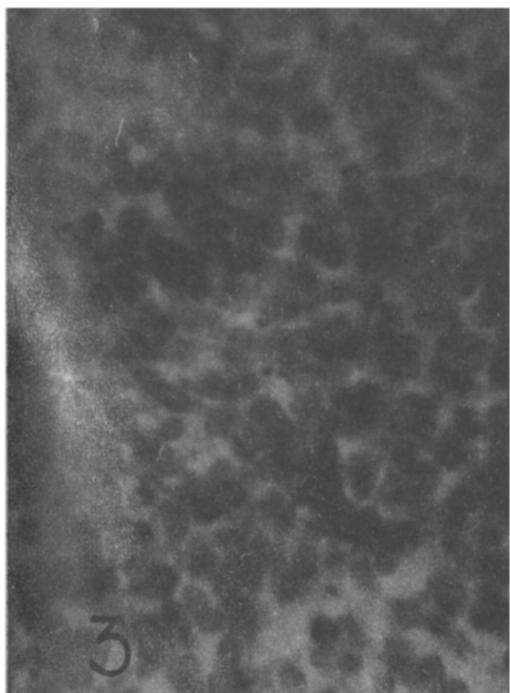
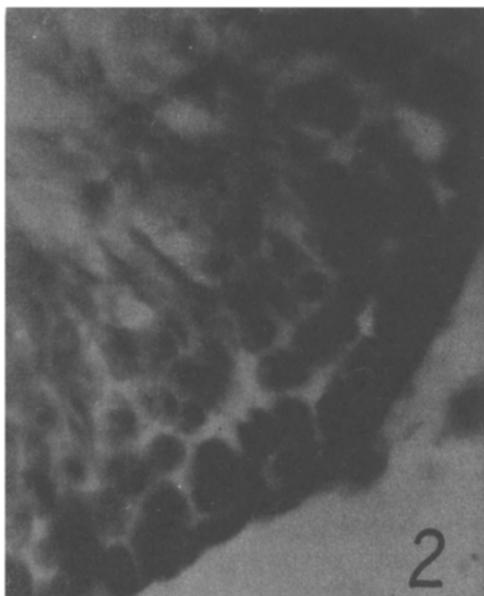
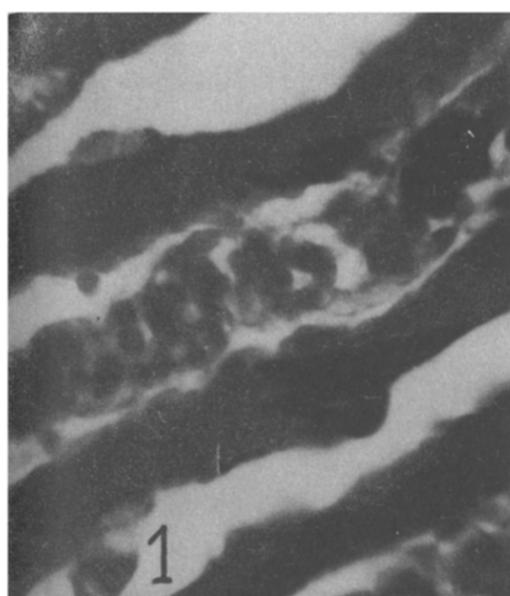


Fig. 1. Mise en évidence de la phosphatase alcaline par la méthode de GOMORI. Substrat: glycéro-phosphate de Na. Durée d'incubation: 2 heures à 37°. 1. Intestin de Souris: Réaction très intense des noyaux et du pôle apical des cellules de la muqueuse. 2. Testicule de Souris: Réaction diminuant d'intensité à mesure que la spermatogénèse progresse. 3. Rate de Souris: Réaction d'intensité inégale dans les différents noyaux. 4. Rein de Souris: Réaction extrêmement forte dans la corticale; l'intensité de la réaction dans les noyaux diminue considérablement dans la médullaire.

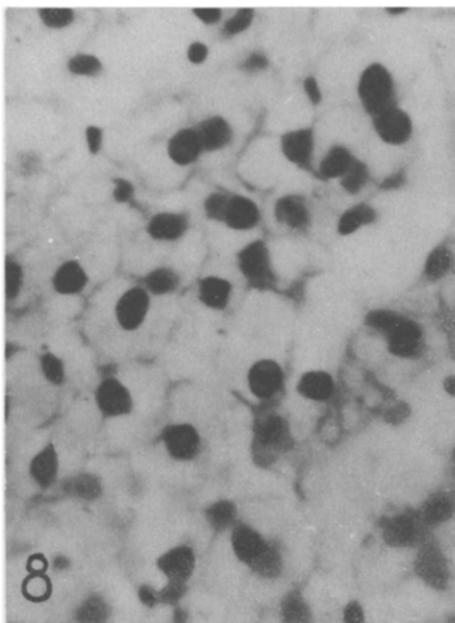
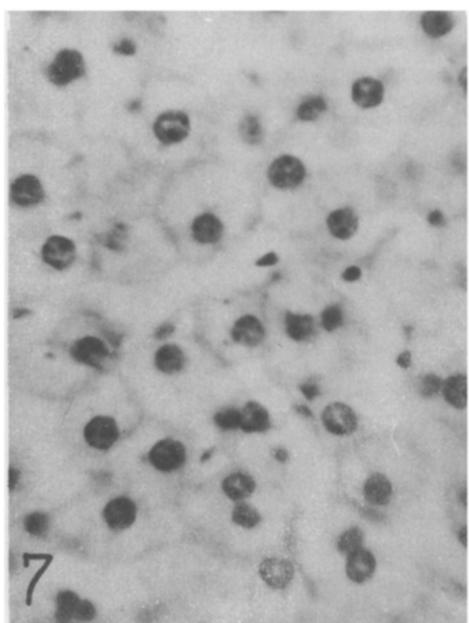
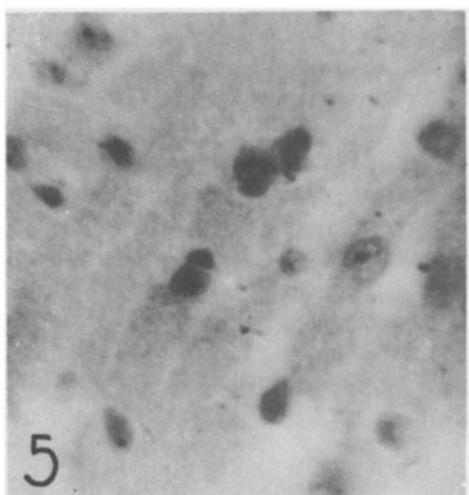


Fig. 2. Mêmes conditions expérimentales que pour la Fig. 1. 5. Cerveau de Souris; Les nucléoles réagissent fortement; la chromatine faiblement. 6. Muscle strié de Souris; Les nombreux noyaux sont invisibles en raison de leur faible réaction. 7. Foie de Rat normal; Réaction positive des nucléoles et de la chromatine. 8. Foie de Rat en régénération (78 heures); L'intensité de la réaction dans les noyaux a très fortement augmenté.

de la muqueuse intestinale fournissent maintenant une réaction intense; c'est encore dans les cryptes de Lieberkühn et les glandes adjacentes que le noircissement des noyaux est le plus marqué, tandis que dans les villosités, les noyaux réagissent plus faiblement que le cytoplasme. Les noyaux des cellules de la rate (surtout dans les corps de Malpighi), comme l'avaient déjà vu WISLOCKI ET DEMPSEY, et du testicule, donnent maintenant une réaction très nettement positive, dont l'intensité n'approche toutefois pas celle de la muqueuse intestinale; dans le testicule, les noyaux des cellules de Sertoli, des spermatogonies et des spermatocytes réagissent plus fortement que ceux des spermatides et des spermatozoïdes, ainsi que l'avait déjà signalé E. KRUGELIS. Dans le rein, toujours après 2 à 3 heures d'incubation, les noyaux de la zone corticale sont nettement positifs, tant dans les glomérules de Malpighi que dans les tubes urinifères; le cytoplasme de ces derniers donne naturellement une réaction extrêmement intense, qui tend à masquer celle des noyaux. Mais dans la zone médullaire, la réaction de la phosphatase est très faible, presque négative. Il en va de même dans le cerveau, où seuls les noyaux des neurones sont positifs, de manière discrète, d'ailleurs. Enfin, on n'observe aucun noircissement appréciable des noyaux dans les muscles striés: ce n'est qu'en prolongeant la durée de l'incubation jusqu'à une dizaine d'heures qu'on parvient à y déceler la présence de l'enzyme.

On voit donc qu'il existe un parallélisme très satisfaisant entre l'intensité de la réaction de GOMORI pour la phosphatase alcaline dans les noyaux des différents organes étudiés et la vitesse du renouvellement du phosphore de l'acide thymonucléique selon HEVESY ET OTTESEN.

Afin de confirmer la réalité d'une pareille relation, nous avons étendu nos observations à deux autres types de cellules où la vitesse du renouvellement du P de l'acide thymonucléique a été mesurée: les globules rouges nucléés de la Poule et le foie en régénération après hépatectomie.

HEVESY ET OTTESEN ont en effet montré que le P de l'acide thymonucléique ne se renouvelle pratiquement pas dans les érythrocytes de la Poule; si on applique la réaction de GOMORI à un frottis de sang de Poule, après fixation à l'alcool, on n'obtient pas de noircissement appréciables des noyaux, même quand l'incubation avec le glycérophosphate se prolonge pendant une quinzaine d'heures. Afin de vérifier ce résultat négatif par une méthode entièrement différente, nous avons préparé une suspension de noyaux de globules rouges de Poule suivant la technique utilisée précédemment par l'un de nous (R. JEENER): cette suspension de noyaux, après lavage, a été incubée avec du glycérophosphate à  $p_H$  9 et le phosphore inorganique libéré a été dosé par la technique de BERENBLUM ET CHAIN. Nous avons constaté que, dans ces conditions, l'hydrolyse du glycérophosphate est très lente et faible. Les noyaux des érythrocytes de Poule sont donc certainement beaucoup plus pauvres en phosphatase alcaline que ceux du foie où DOUNCE a trouvé cet enzyme en abondance; il serait certainement intéressant d'étudier au même point de vue des noyaux isolés de la muqueuse intestinale, en raison de leur richesse en phosphatase alcaline, à en juger par la réaction de GOMORI.

D'autres constatations encore viennent appuyer l'hypothèse d'un lien entre la phosphatase alcaline des noyaux et le renouvellement du P de l'acide thymonucléique: c'est ainsi que HEVESY ET OTTESEN ont établi que les cellules souches des globules rouges, à l'inverse des érythrocytes mûrs, renouvellent leur P thymonucléique à une vitesse appréciable. Or nous avons observé que si on provoque expérimentalement une anémie chez la Poule par injection de phénylhydrazine, les globules rouges immaturés qui se

trouvent en abondance dans le sang donnent une réaction de la phosphatase alcaline nettement positive au niveau de leurs noyaux.

Enfin, on sait par les travaux de BRUES, TRACY ET COHN que la vitesse du renouvellement du Phosphore de l'acide thymonucléique s'accélère très fortement dans le foie lorsque cet organe est le siège d'une importante régénération après large hépatectomie partielle: cette vitesse atteint son maximum 3 à 4 jours après l'opération, au moment où la croissance et l'activité mitotique sont les plus intenses. Nous avons donc jugé utile de suivre la teneur en phosphatase alcaline du foie par la méthode de GOMORI au cours de la régénération chez le rat: conformément aux prévisions, nous avons observé, dans deux expériences distinctes, une nette différence en faveur des noyaux dans le foie en régénération. Si, par exemple, on traite simultanément par la méthode de GOMORI des coupes d'un foie normal et du même organe au 3ème jour de régénération, on constate que les noyaux du foie prélevé avant l'opération ne donnent qu'une très faible réaction après 2 heures d'incubation dans le glycérophosphate; dans le foie en régénération, au contraire, la chromatine et le nucléole sont intensément colorés en noir. L'intensité de la réaction de GOMORI dans le cytoplasme semble au contraire diminuer quelque peu dans le tissu en régénération.

#### IV. DISCUSSION DES RÉSULTATS

On voit que tous nos essais concordent pour indiquer que le rôle de la phosphatase alcaline des noyaux est d'assurer le renouvellement du Phosphore de l'acide thymonucléique; une telle interprétation des résultats concorde également avec ce que nous savons sur le métabolisme des acides nucléiques et les phosphatases dans les tumeurs: les recherches de v. EULER ET HEVESY, tout comme celles de KOHMANN ET RUSCH et DE BRUES, JACKSON ET COHN ont en effet établi clairement que le renouvellement du Phosphore de l'acide thymonucléique est considérablement accéléré chez l'animal cancéreux. Or les dosages de EDLBACHER ET KOLLER ont démontré que la teneur en nucléophosphatase s'élève fortement dans les tumeurs expérimentales; en outre, les recherches cytochimiques plus récentes de BIESELE ET BIESELE, qui ont fait usage, tout comme nous, de la méthode de GOMORI, montrent que la teneur en phosphatase alcaline des noyaux s'élève fortement dans l'épiderme lorsque celui-ci se cancérisé sous l'action du méthyl cholanthrène. La corrélation entre une teneur élevée en phosphatase alcaline des noyaux et un renouvellement rapide du Phosphore de l'acide thymonucléique semble donc bien reposer sur des bases expérimentales nombreuses et solides. Une pareille conclusion s'accorde bien aussi avec les observations cytochimiques de E. KRUGELIS montrant que la chromatine et le nucléole contiennent une phosphatase attaquant l'acide thymonucléique, de préférence à l'acide ribonucléique; c'est au contraire ce dernier qui constitue le meilleur substrat dans le cas du cytoplasme. Toutefois, l'acide thymonucléique n'est déphosphorylé par le noyau que lorsqu'il a été dépolymérisé au préalable: il est donc à supposer qu'une dépolymérase précède la phosphatase alcaline lorsque le Phosphore de l'acide thymonucléique se renouvelle.

Le fait que, selon DANIELLI ET CATCHESIDE ainsi que KRUGELIS, les différents segments des chromosomes géants, dans les glandes salivaires des Diptères, fournissent une réaction phosphatasique d'intensité inégale, suggère la possibilité d'une variation de la vitesse du renouvellement du Phosphore de l'acide thymonucléique, d'un gène à l'autre. Une hypothèse analogue, mais plus accessible à l'expérimentation, se présente

à l'esprit dans le cas des œufs d'Amphibiens en voie de développement, où la phosphatase alcaline offre une distribution uniforme pendant la segmentation seulement: dès la gastrulation, et surtout pendant la neurulation, les noyaux des différentes régions de l'embryon se mettent à réagir avec une intensité inégale (BRACHET, KRUGELIS). Il se peut que dans les régions les plus actives au point de vue morphogénétique, où les noyaux sont plus riches en phosphatase alcaline qu'ailleurs, le renouvellement du Phosphore de l'acide thymonucléique soit particulièrement rapide.

La signification biochimique et biologique de ce renouvellement demeure malheureusement obscure: on serait à première vue tenté de le rapprocher de la synthèse de l'acide thymonucléique au cours des mitoses. Le fait que dans les organes où la vitesse de renouvellement du P thymonucléique est la plus grande (muqueuse intestinale, testicule, rate) les mitoses sont nombreuses, constitue un argument en faveur d'une telle hypothèse; l'accélération de ce métabolisme phosphoré lors de la cancérisation et de la régénération du foie plaide dans le même sens. Toutefois, nous avons vu plus haut que les œufs en voie de segmentation, où l'activité mitolique et la synthèse d'acide thymonucléique sont considérables, sont très pauvres en phosphatase alcaline; cet enzyme n'apparaît en quantités appréciables qu'au moment de la gastrulation, c'est-à-dire lorsque la croissance débute; il ne fait pas de doute que l'embryon est le siège d'une synthèse importante de phosphatase alcaline dans les noyaux au moment où il entre dans une phase active de croissance et de différenciation (MOOG, BRACHET). Dans ces conditions, on peut se demander si la phosphatase alcaline et le renouvellement du P de l'acide thymonucléique ne joueraient pas un rôle dans les phénomènes de croissance et les synthèses concomitantes de protéines, plutôt que dans la multiplication des chromosomes.

Une pareille hypothèse serait en harmonie avec les observations récentes de BRADFIELD et de JEENER suggérant une intervention de la phosphatase alcaline dans la synthèse des protéines fibreuses, ainsi qu'avec les idées courantes (BRACHET, CASPERSSON) sur le rôle des acides nucléiques dans la synthèse des protéines. Si, comme de nombreux biochimistes le pensent actuellement, la synthèse de liaisons peptidiques est liée à des réactions de phosphorylations (P. COHEN, CHANTRENNE) il n'est pas interdit de penser que le métabolisme phosphoré de l'acide thymonucléique, contrôlé par la phosphatase alcaline présente dans la chromatine, ne soit intimement lié à la synthèse des protéines. Pareille supposition trouve un certain appui dans le fait que, selon FRIEDBERG, la muqueuse intestinale, dont on a vu plus haut qu'elle occupe une situation privilégiée au double point de vue de la vitesse du remplacement du P de l'acide thymonucléique et de la richesse en phosphatase alcaline des noyaux, est l'organe où la synthèse des protéines est la plus rapide.

#### RÉSUMÉ

La teneur en phosphatase alcaline des noyaux, telle que le montre la méthode cytochimique de GOMORI, varie fortement d'un organe à l'autre; elle semble bien être toujours en rapport constant avec la vitesse du renouvellement du phosphore de l'acide thymonucléique.

#### SUMMARY

The alkaline phosphatase content of the nuclei from various tissues, as indicated by GOMORI's cytochemical method, shows considerable variations; there is a close and constant relationship between the nuclear alkaline phosphatase content and the rate of the desoxyribonucleic acid turnover.

*Bibliographie p. 430.*

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Gehalt von Kernen an alkalischer Phosphatase, der mit der zytochemischen Methode von GOMORI bestimmt wird, variiert stark bei verschiedenen Organen, er scheint aber immer in konstantem Verhältnis zur Geschwindigkeit der Erneuerung des Phosphors der Thymonukleinsäure zu stehen.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. GOMORI, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 17 (1941) 71.
- 2 G. BOURNE, *Quart. J. Exp. Physiol.*, 32 (1943) 1.
- 3 E. N. WILLMER, *J. Exp. Biol.*, 19 (1942) 11.
- 4 F. MOOG, *Biol. Bull.*, 86 (1944) 51.
- 5 E. J. KRUGELIS, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 20 (1942) 376.
- 6 E. J. KRUGELIS, *Biol. Bull.*, 90 (1946) 220.
- 7 J. DANIELLI ET D. G. CATCHESIDE, *Nature*, 156 (1945) 294.
- 8 G. B. DEMPSEY ET E. W. WISLOCKI, *Amer. J. Anat.*, 76 (1945) 277.
- 9 E. W. WISLOCKI ET G. B. DEMPSEY, *Anat. Rec.*, 96 (1946) 249.
- 10 J. BRACHET, *Enzymologia*, 11 (1943-1945) 336.
- 11 J. BRACHET, *Experientia*, 2 (1946) 143.
- 12 G. HEVESY ET J. OTTESEN, *Acta Physiol. Scand.*, 5 (1943) 237.
- 13 E. HAMMARSTEN ET G. HEVESY, *Acta Physiol. Scand.*, 11 (1946) 335.
- 14 I. BERENBLUM ET J. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 286.
- 15 G. HEVESY ET J. OTTESEN, *Nature*, 156 (1945) 534.
- 16 R. JEENER, *Compt. rend. soc. biol.*, 140 (1946) 679, 689.
- 17 R. JEENER, *Experientia*, 2 (1946) 458.
- 18 A. L. DOUNCE, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 685.
- 19 A. M. BRUES, M. M. TRACY ET W. E. COHN, *J. Biol. Chem.*, 155 (1944) 619.
- 20 T. B. KOHMANN ET H. P. RUSCH, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 46 (1941) 403.
- 21 H. V. EULER ET G. HEVESY, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, 17A (1944), fasc. 30, I.
- 22 A. M. BRUES, E. B. JACKSON ET W. E. COHN, *J. appl. Phys.*, 12 (1941) 231.
- 23 S. EDBACHER ET S. KOLLER, *Z. physiol. Chem.*, 227 (1934) 99.
- 24 J. J. BIESELE ET M. BIESELE, *Cancer Research*, 4 (1944) 75.
- 25 E. J. KRUGELIS, *Biol. Bull.*, 93 (1947) 215.
- 26 J. R. G. BRADFIELD, *Nature*, 157 (1946) 876.
- 27 R. JEENER, *Nature*, 159 (1947) 578.
- 28 J. BRACHET, *Enzymologia*, 10 (1941) 87.
- 29 J. BRACHET, *Arch. Biol.*, 53 (1941) 207.
- 30 T. CASPERSSON, *Naturwiss.*, 29 (1941) 33.
- 31 P. P. COHEN ET MC J. GILVERY, *J. Biol. Chem.*, 169 (1947) 119.
- 32 H. CHANTRENNE, *Nature*, 160 (1947) 603.
- 33 F. FRIEDBERG, *Science*, 105 (1947) 314.

Reçu le 14 juin 1948