

ACIDES NUCLÉIQUES ET
PHOSPHATASES AU COURS DE PHÉNOMÈNES DE CROISSANCE
PROVOQUÉS PAR L'OESTRADIOL ET LA PROLACTINE

par

R. JEENER

Laboratoire de Physiologie animale, Université de Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

Malgré l'intérêt que beaucoup de biologistes témoignent à l'heure actuelle pour l'étude comparative des caractères des cellules en croissance active dans le cas de la croissance normale et dans celui des tumeurs, il est frappant de constater que la comparaison n'a pas été étendue aux organes dont la croissance peut être brusquement déclenchée sous l'influence d'hormones variées. Ces phénomènes de croissance s'effectuent cependant souvent avec une très grande rapidité et il semble que leur étude doive fournir des renseignements précieux sur les caractères de cellules où s'effectue une synthèse active de protéines. Cette étude devra être menée de front par des méthodes biochimiques et histochimiques. C'est ce que nous nous sommes efforcés de faire en prenant comme premiers objets d'investigation les acides nucléiques, dont la détection histochimique et le dosage ont fait de grands progrès au cours de ces dernières années, et les phosphatases, ferment dont la mise en évidence histochimique est la plus aisée. Ce choix ne se justifie pas seulement par des raisons techniques. L'étude parallèle des acides nucléiques et des phosphatases pourrait, en effet, nous fournir d'utiles renseignements sur les rapports qui semblent unir les uns et les autres, ainsi que l'indique notamment le fait que l'abondance de la phosphatase alcaline du noyau des tissus d'un mammifère varie avec la vitesse du "turnover" de l'acide thymonucléique (BRACHET ET JEENER¹). D'autre part, il paraît tous les jours plus évident que les acides nucléiques, en particulier l'acide ribonucléique, doivent jouer un rôle dans la synthèse des protéines (BRACHET, CASPERSSON) et nous avons à nous demander si les phosphatases ne font pas partie du complexe de facteurs intervenant dans cette synthèse.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les deux phénomènes étudiés le plus souvent ont été, d'une part, l'accroissement considérable de la paroi vaginale et utérine de souris adultes, ovariectomisées depuis un mois, sous l'influence d'une injection sous-cutanée de 10 γ de benzoate d'oestradiol en solution dans l'huile, et, d'autre part, l'accroissement non moins marqué de la paroi du jabot de Pigeons adultes en repos sexuel sous l'influence d'injections, répétées toutes les 24 heures, d'extraits du lobe antérieur de l'hypophyse de vache contenant de la prolactine et préparés suivant la technique de GARDNER ET TURNER² (20 mg poids sec par injection),

Bibliographie p. 452/453.

ces injections étant faites dans le muscle pectoral. Accessoirement, ont été utilisés le pancréas de souris ou de rat, le foie, le cerveau et le rein des mêmes animaux injectés ou non d'œstradiol.

Les dosages ont été effectués sur les tissus divisés en coupes minces à l'aide d'un microtome à congélation et homogénéisés à la température de 2° C à l'aide d'un broyeur constitué par un cône de verre rodé s'ajustant sur le fond également rodé d'un tube de centrifugeuse épais.

La détermination de l'activité de la phosphatase alcaline est pratiquée sur une partie de la suspension ajoutée à un mélange de glycérophosphate de soude et de nitrate de calcium en présence d'un tampon au véronal et de chlorure de magnésium (FELL ET DANIELLI³). Le P orthophosphorique libéré est dosé par la méthode de BERENBLUM ET CHAIN⁴.

Les mêmes suspensions ont été utilisées pour les dosages de l'acide ribonucléique par l'orcine et de l'acide thymonucléique par la diphenylamine (SCHNEIDER⁵). Les quantités trouvées sont rapportées au poids sec d'une partie de la suspension précipitée par l'acide trichloracétique, ou à la teneur en azote total de ce précipité (méthode de KJELDAHL, appareil de MARKHAM⁶).

La mise en évidence histochimique des phosphatases a été réalisée par la méthode de GÖMORI légèrement modifiée. Chaque fois qu'une comparaison devait être faite entre deux séries de coupes, celles-ci ont été traitées simultanément sur la même lame porte-objet. En outre, la même comparaison était effectuée après action du glycérophosphate pendant des durées variables (BRACHET ET JEENER¹) en commençant par des durées suffisamment courtes pour que des différences entre les quantités de phosphatases présentes puissent se manifester.

La détection des acides nucléiques a été effectuée, sur du matériel fixé au Zenker, par la technique de FEULGEN, pour l'acide thymonucléique, le bleu de toluidine et la ribonucléase suivant BRACHET pour l'acide ribonucléique. La ribonucléase était préparée suivant la technique de FISCHER *et coll.*⁷.

RÉSULTATS

A. CROISSANCE DU VAGIN ET DE L'UTÉRUS DE SOURIS SOUS L'INFLUENCE DE L'ŒSTRAZIOL

Vagin. Examen histochimique

La description des effets de l'œstradiol sur l'épithélium vaginal de la souris castrée est classique. Nous pouvons nous limiter ici aux faits qui nous intéressent directement. L'épithélium de la Souris castrée depuis un mois est constitué par deux couches de cellules seulement. La couche profonde présente des noyaux riches en acide thymonucléique, exceptionnellement à l'état de mitose, et une très faible quantité de cytoplasme contenant de l'acide ribonucléique peu abondant. La couche superficielle ne contient que fort peu de chacun de ces acides nucléiques. L'injection de l'œstradiol ne provoque aucun changement dans la couche superficielle alors que la couche profonde entre en prolifération active. La hauteur des cellules augmente considérablement, le volume des noyaux s'accroît, le cytoplasme devient plus abondant et s'enrichit en acide ribonucléique. Les cellules résultant de la prolifération de la couche basale changent rapidement d'aspect. Déjà 24 heures après l'injection, il en existe 5 à 6 couches. Les plus voisines de la couche profonde où se produit la multiplication cellulaire sont remarquables par le grand volume de leur cytoplasme et son extrême basophilie. En nous écartant progressivement de la

couche basale, nous rencontrons des cellules plus vieilles, de plus en plus aplatis et dont la basophilie cytoplasmique décroît progressivement jusqu'à disparaître presque complètement. Simultanément la taille des noyaux diminue ainsi que la quantité d'acide thymonucléique qu'ils contiennent (voir Fig. 2, a et b). Cette basophilie cytoplasmique paraît entièrement due à l'accumulation d'acide ribonucléique. En effet, un traitement de 30 min à 60° à l'aide d'une solution de ribonucléase fait disparaître toute trace de colorabilité du cytoplasme par le bleu de toluidine alors que le traitement des coupes témoins à l'aide d'une solution de même concentration en sulfate d'ammonium et de même p_H ne diminue que fort peu cette colorabilité.

Comparons la préparation qui vient d'être décrite à une autre, provenant du même organe, où les groupes sulfhydryles des protéines ont été mis en évidence par leur réaction avec le ferricyanure et la transformation du ferrocyanure formé en bleu de Prusse (CHÈVREMONT⁸). Au fur et à mesure que la basophilie cytoplasmique diminue le nombre de -SH réactifs augmente. Au niveau des cellules où la basophilie a entièrement disparu la réaction des -SH atteint son maximum et se manifeste par une coloration d'un bleu intense. Superposés à cette couche riche en groupes -SH réactifs se trouve enfin une mince couche de cellules kératinisées dans laquelle la réaction des -SH a totalement et brusquement disparu. Chez la Souris castrée aucune trace de réaction des groupes -SH ne se présente dans l'épithélium vaginal. Ces caractères histochimiques de l'épithélium en croissance témoignent de l'abondante synthèse de kératine qui y est effectuée.

Les effets de l'injection de l'oestradiol se manifestent de manière non moins caractéristique sur les coupes où la phosphatase alcaline a été mise en évidence. L'épithélium vaginal de la Souris castrée ne montre rien de plus que le tissu sous-jacent, c'est-à-dire un très léger précipité de sulfure de cobalt dans les noyaux et des traces de réaction à peine visibles dans le cytoplasme. Par contre, 24 heures après l'injection de 10 γ d'oestradiol, l'épithélium épaisse du vagin se présente comme un large trait noir visible à l'œil nu même si l'action de la phosphatase sur le substrat n'a duré qu'une heure. Ainsi que le montre la Fig. 1 (a et b) cette réaction fort intense se manifeste essentiellement dans le cytoplasme, les noyaux apparaissant sur les coupes comme de larges espaces clairs. Il est à noter, d'autre part, qu'après 24 heures d'action de l'oestradiol, cette grande abondance de la phosphatase cytoplasmique est réalisée dans toute l'épaisseur de l'épithélium alors que, après 3 jours, la réaction des phosphatases est fort atténuée dans la couche superficielle de cellules où la kératinisation est complète. Le tissu sous-jacent montre également une accentuation de la réaction des phosphatases, mais celle-ci est insignifiante en comparaison de ce qui se produit dans l'épithélium.

Dans quelques expériences, le glycérophosphate de soude a été remplacé soit par de l'acide zymonucléique (fraction A de CHANTRENNE⁹) soit par les tétranucléotides résultant de la dépolymérisation de l'acide thymonucléique par la thymonucléase*.

L'image histologique obtenue après action du premier substrat était identique à celle obtenue à l'aide de glycérophosphate de soude. Par contre, l'emploi des tétranucléotides de l'acide thymonucléique n'a conduit qu'à des réactions phosphatasiques très faibles ou même douteuses.

Vagin. Données quantitatives

L'épaississement de l'épithélium vaginal réalisé en 24 heures sous l'influence de 10 γ d'oestradiol se traduit par une augmentation de 50 à 60% de l'azote protéique total

* Je remercie MM. CHANTRENNE ET REBUFFAT qui ont bien voulu mettre ces deux substances à ma disposition.

de l'organe. Cette augmentation résulte pour la plus grande partie (90%) de l'apparition de protéines insolubles en solutions salines de diverses concentrations (0.005 à 0.5 M), où la kératine prend vraisemblablement la plus large place.

Que l'extrême basophilie cytoplasmique de l'épithélium vaginal en prolifération doive être attribuée à la présence d'acide ribonucléique se trouve confirmé par le fait que, 24 heures après l'injection de l'œstradiol, la vagin en contient au total 160 à 180% de plus, la teneur de l'organe en acide ribonucléique par rapport au poids sec total passant de 1.6 à 2.7%, par exemple. Enfin, la multiplication des cellules de l'épithélium vaginal se traduit par une augmentation de 100% de la quantité totale d'acide thymonucléique présente dans le vagin, la quantité d'acide thymonucléique rapportée au poids sec passant de 4.9 à 6.4%.

TABLEAU I
ACTION DE 20 γ D'ŒSTRAZIOL SUR LE VAGIN ET L'UTÉRUS D'UNE SOURIS CASTRÉE: PRÉLÈVEMENTS
24 h APRÈS L'INJECTION

	VAGIN					
	Poids humide en mg	Poids sec en mg	R.N. total en γ	R.N. % par rapport au poids sec	D.R.N. total en γ	D.R.N. % par rapport au poids sec
Témoin . .	8	1.9	30	1.6	94	4.9
Oestradiol .	17.6	3	80	2.7	192	6.4
UTÉRUS						
Témoin . .	12.6	2.4	96	4.0	340	14.4
Oestradiol .	35	5.3	200	3.8	340	6.4

La suspension de tissu vaginal broyé provoque à p_H 9 la libération à partir de glycérophosphate de soude de quantités de phosphore inorganique énormément accrues après 24 heures d'action préalable de l'œstradiol. Le P libéré en 3 heures passe, par exemple, de 114 γ dans le vagin au repos à 931 γ par mg de N protéique dans le vagin en croissance. L'activité phosphatasique la plus élevée qui ait été observée après 24 h d'action de l'œstradiol se traduisait par une libération de 1492 γ de P par mg de N protéique en 3 h à 37°.

Il est à noter que ces données quantitatives valent pour l'ensemble de l'organe. Les concentrations des cellules de l'épithélium vaginal en acides nucléiques et en phosphatasées sont évidemment beaucoup plus élevées, puisque les tissus sous-jacents ne contiennent que de très petites quantités de ces substances, ainsi que le révèle l'examen histochimique.

Utérus. Examen histochimique

L'injection de 10 γ d'œstradiol à une Souris castrée provoque une augmentation massive du volume de l'organe en 24 heures. Cette augmentation de volume porte principalement sur la musculature circulaire et longitudinale où n'apparaissent cependant pas de mitoses. Des divisions cellulaires se produisent dans la muqueuse mais sont peu nombreuses. Compte tenu du fait que la muqueuse de l'utérus ne représente chez la Souris qu'une portion minime du volume de l'organe, la croissance de l'utérus diffère donc nettement de celle du vagin par le fait qu'elle se produit sans être accompagnée de multi-

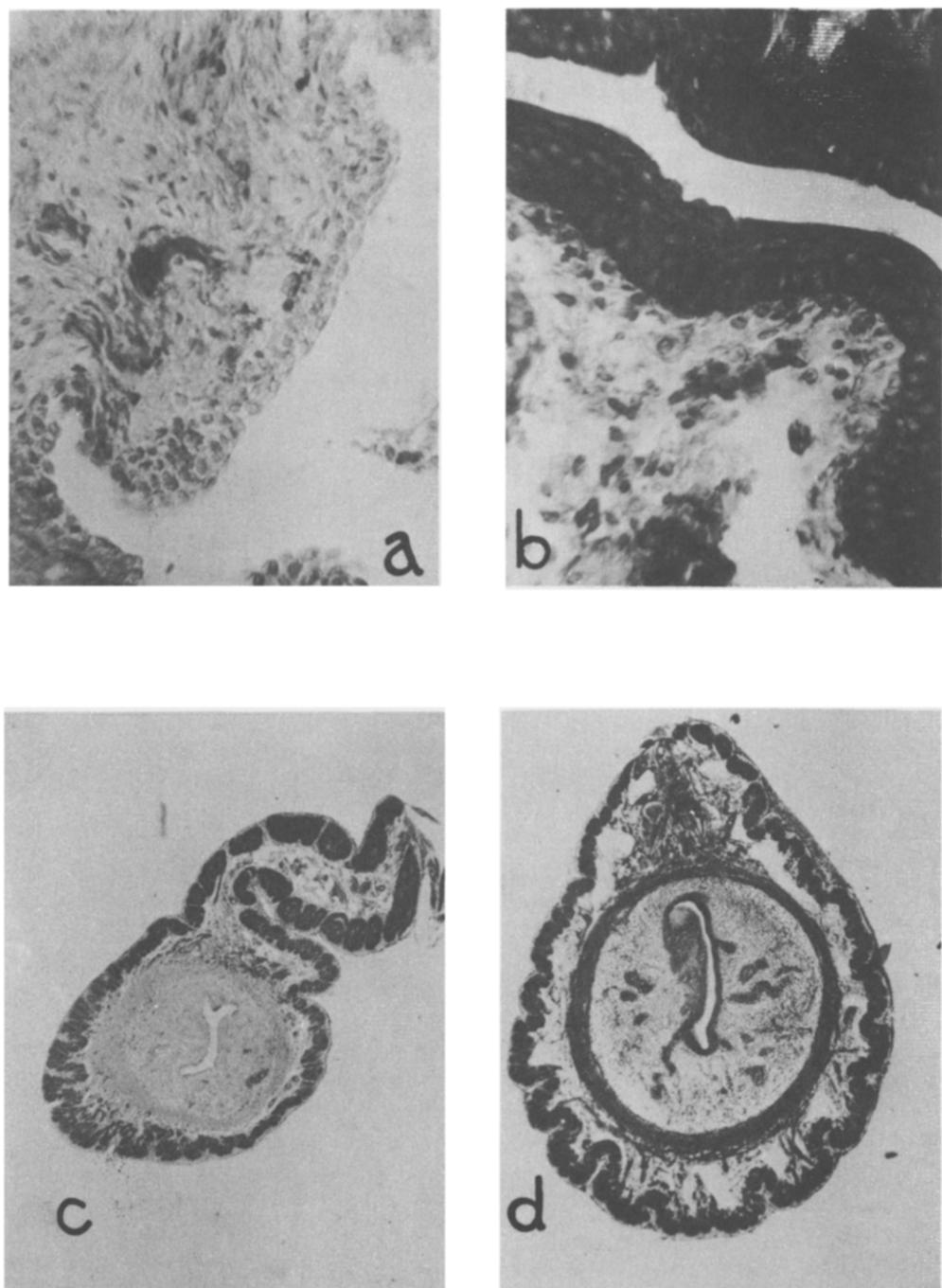


Fig. 1. Mise en évidence de l'activité de la phosphatase alcaline (méthode de GÖMORI) dans: a) la paroi du vagin d'une Souris castrée, b) une paroi semblable 24 h après l'injection de 10γ d'oestradiol, c) l'utérus d'une Souris castrée, d) un organe semblable 24 h après l'injection de 10γ d'oestradiol.

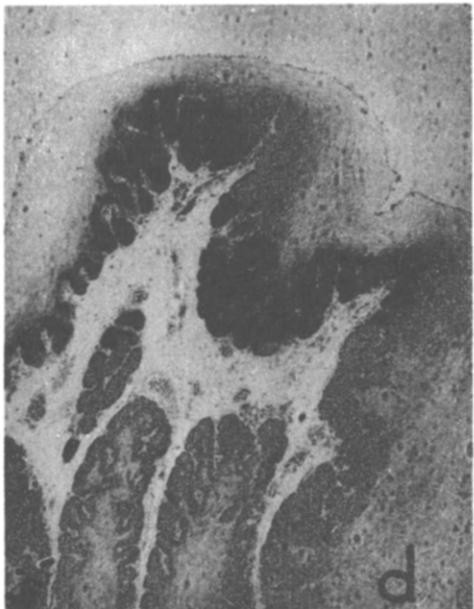
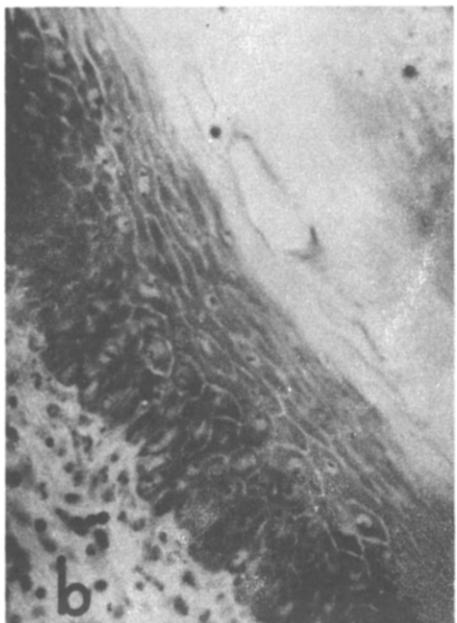
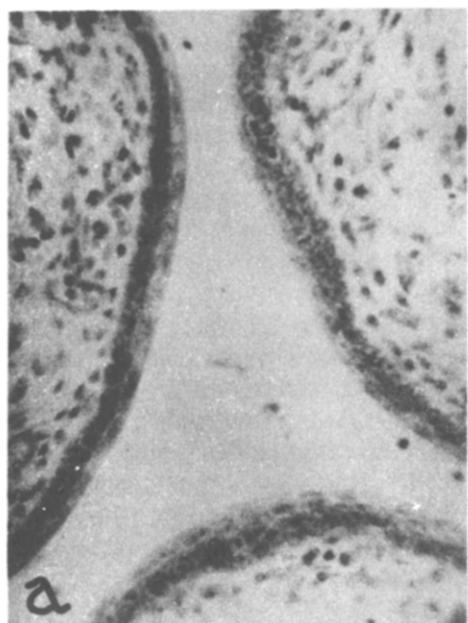


Fig. 2. Mise en évidence des acides ribo- et thymonucléique par le bleu de toluidine dans: a) la paroi du vagin d'une Souris castrée, b) une paroi semblable 48 h après l'injection de 10 γ d'oestradiol, c) la paroi de la glande du jabot d'un Pigeon à l'état de repos, d) une paroi semblable 48 h après l'injection de prolactine.

plication cellulaire. Nos observations cadrent à ce point de vue avec celles de ALLEN, SMITH ET GARDNER¹⁰ qui, même en bloquant les mitoses en métaphase par la colchicine et en multipliant ainsi les chances d'observer celles qui se seraient produites dans les 24 heures qui suivent l'injection d'hormones, n'arrivent pas à en mettre en évidence dans la musculature de l'utérus, alors qu'elles apparaissent en très grand nombre dans l'épithélium vaginal.

La musculature de l'utérus de la Souris castrée est extrêmement riche en noyaux serrés les uns contre les autres. Ces noyaux montrent une réaction de FEULGEN intense. Lorsque le volume de l'utérus augmente sous l'influence de l'œstradiol, ces noyaux grossissent, s'écartent et l'intensité de leur coloration diminue fortement. Les noyaux de la muqueuse restent peu nombreux et ne montrent qu'une réaction de FEULGEN faible, aussi bien après l'injection qu'avant. L'acide thymonucléique qu'ils contiennent ne représente qu'une faible portion de l'acide thymonucléique total de l'organe.

Le cytoplasme des cellules musculaires de l'animal castré est peu abondant et ne laisse que difficilement apprécier sa teneur en acide ribonucléique sur les coupes traitées par le bleu de toluidine, tant la basophilie des noyaux est intense. Sous l'influence de l'œstradiol le volume du cytoplasme s'accroît notablement et la présence d'acide ribonucléique peut y être mise en évidence. Cette augmentation du volume du cytoplasme se produit en même temps que s'accentue la différenciation des fibres musculaires qui prennent l'allure caractéristique de fuseaux allongés. Cette différenciation plus marquée est peut-être à mettre en rapport avec l'activité contractile spontanée de l'utérus qui apparaît simultanément.

Ainsi que le montre la comparaison des microphotographies *c* et *d* de la Fig. 1 l'action de l'œstradiol se traduit, déjà après 24 heures, par une augmentation massive de la réaction de GÖMORI pour la phosphatase alcaline. Dans l'utérus de la Souris castrée depuis 1 mois la muqueuse et la musculature circulaire ne montrent aucune réaction. Le dépôt de sulfure de cobalt est au contraire assez abondant dans la musculature longitudinale dont la différenciation histologique reste plus nette que celle de la musculature circulaire. Chez les Souris castrées depuis 2 ou 3 mois, la réaction phosphatasique de la musculature longitudinale est beaucoup plus faible. Les diverses régions de l'utérus répondent inégalement à l'action de l'œstradiol, ainsi que ATKINSON ET ELFTMANN¹¹ l'ont déjà observé. La modification la plus frappante est l'apparition sur les coupes transversales de l'organe d'un épais anneau noir de sulfure de cobalt dans toute l'étendue de la couche musculaire circulaire où la phosphatase alcaline a subi un enrichissement considérable se manifestant principalement dans les noyaux cellulaires.

La teneur en phosphatase alcaline de la musculature longitudinale augmente également, mais cette augmentation n'est nette que chez les animaux castrés depuis 2 mois ou plus. Enfin, la muqueuse utérine s'enrichit en phosphatase alcaline sous l'influence de l'œstradiol. L'examen des coupes montre que la quantité de ferment apparu dans cette région ne représente qu'une partie assez minime de celle née dans la musculature du fait du faible développement de cette muqueuse chez la Souris.

La réaction de GÖMORI effectuée en remplaçant le glycérophosphate de soude par du ribonucléate ou du thymonucléate a fait apparaître en présence du ribonucléate des images histologiques presque identiques à celles obtenues avec le glycérophosphate, alors qu'en présence du thymonucléate du P inorganique ne paraissait pas avoir été libéré, sauf au niveau des cellules de la muqueuse et en très petite quantité seulement (substrats identiques à ceux employés dans l'étude du vagin).

Il ne semble pas se vérifier à première vue sur notre matériel que le noyau et le cytoplasme contiendraient des systèmes enzymatiques différents, capables de libérer le P inorganique à partir des tétranucléotides de l'acide thymonucléique dans le cas du noyau, à partir de l'acide ribonucléique dans le cas du cytoplasme (KRUGELIS¹²).

En effet, l'acide ribonucléique donne une réaction presque aussi intense que le glycérophosphate de soude à la fois dans le cytoplasme des cellules de l'épithélium vaginal (voir plus haut) et dans le noyau des cellules musculaires de l'utérus.

Utérus. Données quantitatives

Sous l'influence d'une injection de 10 γ d'oestradiol le poids humide de l'organe augmente en 24 heures de 100 à 200%, son poids sec de 57.5 à 121%.

Contrairement à ce qui se passe dans le vagin cette augmentation du poids sec s'accompagne d'un accroissement parallèle des fractions protéiques solubles et insolubles dans l'Edsall. Nous avons cherché à savoir si la quantité de myosine présente dans l'utérus s'accroissait sous l'influence de l'oestradiol. Les données recueillies à cet égard sont peu satisfaisantes. La technique utilisée pour le dosage de la myosine a consisté à extraire le tissu finement divisé par le liquide d'Edsall en agitant mécaniquement la suspension pendant quelques heures. La solution obtenue était ensuite centrifugée et dialysée. Nous n'avons pu éviter que la nucléohistone, présente en grandes quantités dans l'utérus et dissoute par l'Edsall ne précipite en même temps que la myosine. Pour obtenir le poids de la myosine recueillie nous avons soustrait du poids total du précipité le poids de la nucléohistone, calculé d'après la quantité d'acide thymonucléique en admettant que cet acide représentait 50% du poids du nucléoprotéide. Le calcul effectué sur cette base conduit à admettre une augmentation du poids de la myosine de 70 à 80% en 24 heures. L'examen histologique confirme dans une certaine mesure cette conclusion. Rappelons en effet que les cellules de la musculature circulaire de l'utérus au repos présentent un cytoplasme très peu abondant, les noyaux étant tassés étroitement les uns contre les autres. Sous l'influence de l'oestradiol on voit la masse de cytoplasme augmenter rapidement et les fibres musculaires acquérir leur différenciation typique.

Parallèlement à l'accroissement de la quantité de protéines présente dans l'utérus, se produit un accroissement de la quantité totale d'acide ribonucléique (90 à 100%), mais, contrairement à ce qui se produit dans le cas du vagin, la teneur en acide ribonucléique de l'utérus, rapportée au poids sec, ne se modifie pas de manière appréciable.

Comme pouvait le faire supposer l'examen histochimique, la quantité totale d'acide thymonucléique n'augmente pas en 24 heures sous l'influence de l'oestradiol. Quant à la teneur en acide thymonucléique rapportée au poids sec, elle diminue en 24 heures de 20 à 50%.

Enfin, tout comme dans le cas du vagin, l'oestradiol produit en 24 heures une très considérable augmentation de la teneur de l'organe en phosphatase alcaline. Rapportées à 1 mg d'azote protéique, les quantités d'orthophosphate libérées à partir du glycérophosphate de soude s'accroissent de 120 à 500% en 24 heures, la quantité la plus grande d'orthophosphate libérée en 3 heures à 37° par 1 mg de N protéique ayant été de 1590 γ de P.

Foie, rein, cerveau, plasma sanguin

La puissante action de l'oestradiol sur la teneur en phosphatase alcaline du vagin

et de l'utérus ne s'exerce nullement sur l'ensemble des tissus de l'animal. Nous n'avons observé aucune modification de cette teneur dans le rein, le cerveau et le plasma sanguin. Dans le cas du foie, une légère augmentation de la teneur en phosphatase alcaline semble se manifester (15 à 30%), mais elle est trop faible pour que nous puissions admettre sa réalité sans une étude statistique qui n'a pas été faite. L'examen histochimique confirme toutefois l'existence du phénomène.

B. CROISSANCE DE LA MUQUEUSE DU JABOT DE PIGEON SOUS L'INFLUENCE DE LA PROLACTINE

Examen histochimique

Les caractères histochimiques de la croissance des muqueuses vaginale et utérine sous l'influence de l'œstradiol pourraient être considérés, soit comme des manifestations particulières de l'action d'une hormone stéroïde, soit comme des caractères généraux de tout processus de croissance. Il nous a paru intéressant d'essayer de trancher la question en comparant l'action d'une hormone protéique, la prolactine, à celle de l'œstradiol.

Lorsqu'un Pigeon a été isolé pendant quelques semaines les "glandes" du jabot se trouvent à l'état de repos et apparaissent comme deux zones circulaires de la paroi à peine différencierées par leur épaisseur et leur vascularisation. A leur niveau, la muqueuse est constituée par une mince couche de cellules à noyaux très basophiles et ne montrant qu'un très petit nombre de mitoses.

Du côté de la lumière de la glande, cette couche cellulaire est revêtue de cellules aplatis montrant des traces d'un processus de kératinisation, ainsi qu'en témoigne la présence dans les cellules les plus profondes de protéines réduisant très légèrement le ferricyanure (technique de CHÈVREMONT).

La muqueuse du jabot est enfin revêtue extérieurement d'une mince couche musculaire et conjonctive.

Deux doses de 10 ou 20 mg de la préparation contenant la prolactine injectées dans les muscles pectoraux à 24 heures d'intervalle provoquent dans la couche profonde de la muqueuse une multiplication cellulaire intense accompagnée d'un enrichissement du cytoplasme en acide ribonucléique. Cette transformation de la muqueuse a un caractère massif, ainsi qu'en témoignent les microphotographies c et d, Fig. 2. Tout comme dans le cas du vagin, une multiplication cellulaire rapide ne se poursuit que dans les régions les plus profondes de l'épithélium. Il se constitue ainsi des couches superposées de cellules où le cytoplasme devient très volumineux en même temps que les mitoses s'arrêtent. Ces cellules conservent la plus grande partie de l'acide ribonucléique qu'elles contenaient, leur noyau restant riche en acide thymonucléique. Contrairement à ce qui se passe dans le cas du vagin, elles ne s'aplatissent pas et ne montrent aucun signe de kératinisation.

Notons d'autre part que ce rapide épaississement de l'épithélium du jabot n'est pas accompagné de l'édification de tissu conjonctif. Au fur et à mesure que la paroi du jabot s'épaissit, les cellules les plus superficielles se détachent et constituent une masse grumeleuse dans la lumière de l'organe.

L'épaississement de la paroi du jabot se produit essentiellement dans l'épithélium dont nous venons de décrire la prolifération. Les couches musculaire et conjonctive sous-jacentes se renforcent également, mais dans des proportions beaucoup plus faibles.

La prolactine est sans effet sur l'intensité de la réaction de GÖMORI pour la phosphatase alcaline. Aussi bien dans la muqueuse en prolifération que dans la muqueuse au repos, cette réaction, à peine marquée, même après des incubations de 24 heures en

présence du substrat, se limite aux noyaux. A ce point de vue, les caractères de la croissance de la muqueuse du jabot de Pigeon s'opposent nettement à ce que nous avons observé dans le cas de la muqueuse vaginale de Souris.

Données quantitatives

Les cellules de la muqueuse du jabot se dissocient aisément et se séparent de la couche musculaire et conjonctive sous-jacente par simple écrasement de l'organe à l'aide du pilon de l'homogénéiseur décrit au début de ce travail.

Les dosages effectués sur la glande du jabot entière ont toujours été exécutés sur l'organe au repos ou au début de sa croissance (48 heures après l'injection, le plus souvent) de manière que les résultats obtenus ne soient pas rendus difficiles à interpréter par l'accumulation des produits élaborés dans les cellules prêtes à se détacher de la muqueuse. Après 48 heures d'action de la prolactine, le poids sec des glandes du jabot a augmenté de 100 à 153%. L'azote protéique augmente dans les mêmes proportions. Il s'est donc produit dans l'organe étudié une synthèse de protéines dont la vitesse est comparable à celle qui se manifeste dans le vagin de la Souris sous l'influence de l'oestradiol. Comme dans ce dernier organe, l'accroissement de la vitesse de synthèse des protéines s'accompagne d'une augmentation de la teneur de l'organe en acide ribonucléique calculée par rapport à l'azote protéique (55 à 60% en 48 heures). Par contre, la teneur en acide thymonucléique, rapportée à l'azote protéique, ne change pas, bien que la quantité totale d'acide thymonucléique augmente en même temps que se multiplient les cellules.

Phosphatases

L'activité de la phosphatase alcaline du tissu homogénéisé est extrêmement faible (30γ de P libéré par mg de N protéique en 1 heure) et n'augmente pas sous l'influence de la prolactine. Ce fait est frappant si l'on se rappelle que le vagin excité par l'oestradiol contenait une quantité de phosphatase alcaline capable de libérer près de 500γ par mg de N protéique dans le même temps.

Nous avons examiné si la présence, dans le jabot, de phosphatase acide, n'expliquerait pas dans une certaine mesure la différence entre vagin de Souris et jabot de Pigeon. L'activité de la phosphatase acide (tampon à p_H 5) est beaucoup plus faible encore que celle de la phosphatase alcaline et n'augmente pas plus que cette dernière après injection de prolactine. L'examen histochimique permet de confirmer cette conclusion. La croissance rapide de l'épithélium du jabot ne s'accompagne donc apparemment d'aucune augmentation de la teneur en phosphatase.

C. LES PHOSPHATASES DU PANCRÉAS

En présence des résultats discordants fournis par l'étude des relations qui pourraient exister entre la croissance d'un organe et l'abondance des phosphatases qu'il renferme, il a paru intéressant d'examiner la teneur en phosphatases du pancréas où s'effectue une synthèse massive de protéines indépendante de tout phénomène de multiplication cellulaire.

Ainsi que plusieurs auteurs l'ont déjà signalé, l'étude histochimique de la phosphatase alcaline du pancréas de Mammifères variés ne permet pas la mise en évidence de ce ferment dans les cellules exocrines. Seules les parois des canaux sécrétateurs paraissent en contenir (pr. bibl. voir JACOBY¹³).

L'étude quantitative de l'activité phosphatasique du tissu pancréatique homogénéisé du Rat confirme parfaitement ces données. En présence d'un tampon à p_{H} 9, pareille préparation ne libère que 7 γ de P par heure et par mg de N protéique. C'est là l'activité de loin la plus faible que nous avons eu l'occasion de constater dans les divers organes examinés au cours de la présente recherche.

L'activité phosphatasique qui se manifeste à p_{H} 5 est plus faible encore (2 à 5 γ par mg de N protéique en 3 heures).

L'extrême pauvreté en phosphatasases du pancréas pourrait n'être qu'apparente et résulter d'une action protéolytique qu'exercerait sur ces ferment la trypsine pancréatique au cours de la préparation des extraits et des coupes, ou pendant la période d'incubation dans le glycérophosphate de soude. Nous pensons avoir pu écarter cette cause d'erreur en montrant que l'activité d'une préparation de phosphatase de l'intestin de Souris, purifiée suivant ALBERS, n'était en rien diminuée lorsqu'elle était ajoutée au tissu pancréatique de Rat au moment où celui-ci était homogénéisé, le mélange obtenu étant ensuite traité suivant la technique habituelle pour la détermination de la phosphatase alcaline.

Cette donnée cadre d'ailleurs parfaitement avec les résultats déjà anciens de EHRENSVÄRD¹⁴, suivant lequel la trypsine n'inactivierait pas la phosphatase alcaline.

Notons que les cellules sécrétrices du pancréas, si pauvres en phosphatasases, sont en même temps parmi les plus riches en acide ribonucléique (BRACHET¹⁵).

DISCUSSION

Les observations exposées ci-dessus montrent dans tous les cas étudiés que les cellules où une synthèse rapide de protéines est provoquée par une hormone stéroïde (oestradiol) ou une hormone protéique (prolactine) s'enrichissent en acide ribonucléique, ainsi que le prouvent aussi bien le dosage de ce corps par rapport à l'azote protéique que sa mise en évidence histochimique par la méthode de BRACHET. Pareille relation est bien connue dans d'autres cas depuis les recherches de BRACHET et de CASPERSSON*. Il est cependant intéressant de noter qu'elle s'est manifestée au cours de nos expériences dans des conditions physiologiques fort différentes.

La synthèse des protéines dans la muqueuse vaginale de la Souris et dans la muqueuse du jabot de Pigeon est en effet accompagnée d'une multiplication cellulaire intense. Celle-ci, par contre, est nulle dans la musculature de l'utérus de Souris. Or, dans les trois cas, la teneur en acide ribonucléique augmente, l'acide thymonucléique se comportant de façons diverses.

Là où il y a multiplication cellulaire (vagin, jabot), la quantité totale d'acide thymonucléique augmente, la teneur de l'organe en acide thymonucléique par unité de poids sec augmentant dans le cas du vagin restant constante dans le cas du jabot. Par contre, la quantité totale d'acide thymonucléique de l'utérus ne s'accroît pas. Comme une synthèse importante de protéines est néanmoins réalisée, la teneur de cet organe en acide thymonucléique par unité de poids sec diminue.

Il existe donc un lien quantitatif entre la synthèse des protéines et l'abondance de l'acide ribonucléique, alors que semblable lien ne ressort nullement de nos observations dans le cas de l'acide thymonucléique.

* Signalons notamment dans le domaine de l'endocrinologie les travaux de MM. DESCLIN²³ ET HERLANT²⁴.

Bibliographie p. 452/453.

Notons toutefois que l'utérus au repos est d'une richesse exceptionnelle en acide thymonucléique et que la croissance de l'organe pourrait se trouver en quelque sorte préparée dans l'état de repos. L'absence d'accroissement de la quantité d'acide thymonucléique ne signifie nullement que ce corps ne présente aucune activité métabolique en liaison avec la synthèse des protéines, mais, peut-être, que les quantités qui se dégradent sont égales à celles qui sont synthétisées.

Une seconde remarque peut être faite. Aussi bien dans le cas de l'utérus que dans celui du vagin et du jabot de Pigeon, la quantité d'acide ribonucléique synthétisé au cours de la croissance est égale à 3.5 à 5% de la quantité de protéines néoformées.

L'existence de cette relation constante apporte une base plus précise à l'idée que la synthèse des protéines est liée à la présence d'acide ribonucléique et nous montre en outre que le même lien quantitatif se retrouve dans des conditions physiologiques très différentes. En effet, la muqueuse du vagin de Souris et celle du jabot de Pigeon montrent d'innombrables mitoses, alors que la musculature de l'utérus, qui constitue la plus grande partie de cet organe, en est totalement dépourvue. D'autre part, le cytoplasme des cellules de la muqueuse vaginale est infiniment plus riche en acide ribonucléique que celui des fibres musculaires de l'utérus ainsi qu'en témoigne leur affinité très inégale pour les colorants basiques.

Puisque la cellule ne peut, semble-t-il, synthétiser de protéines sans synthétiser en même temps une proportion fixe d'acide ribonucléique, et que, d'autre part, la plus grande partie de ce corps se trouve combiné dans des complexes de dimensions macromoléculaires (granules) contenant en même temps des protéines et des phospholipides, l'hypothèse que les protéines sont initialement synthétisées sous la forme de granules paraît justifiée. Ces granules présentant au point de vue de leur composition et de leurs dimensions des analogies avec certains virus (BRACHET ET JEENER¹⁶), nous pourrions imaginer qu'ils se multiplient par un mécanisme analogue. Une première phase de la synthèse des protéines au cours de laquelle cette multiplication s'effectuerait, serait caractérisée par la présence de grandes quantités d'acide ribonucléique. Mais, ainsi que nous l'avons signalé, la teneur en acide ribonucléique des cellules de la muqueuse vaginale et de la muqueuse du jabot diminue lorsqu'elles vieillissent et que des protéines spéciales (kératine du vagin, protéines caractéristiques du "lait" de Pigeon) s'y accumulent. Cette seconde phase (différenciation) pourrait correspondre à un remaniement des molécules initialement synthétisées par un processus que les phénomènes de remplacement des protéines étudiés par SCHOENHEIMER ET RITTENBERG rendent concevable. Cette hypothèse cadrerait avec les vues récemment exposées par THORELL¹⁷ qui admet que la synthèse de l'hémoglobine ne s'effectue qu'au cours d'une seconde phase de la maturation de l'érythroblaste pendant laquelle la teneur en acide ribonucléique, très élevée pendant la phase de croissance, diminue considérablement.

Si les divers organes étudiés au cours de ce travail se comportent de manière fort semblable en ce qui concerne l'acide ribonucléique, ils montrent au contraire les différences les plus nettes si l'on étudie les variations subies par les phosphatases du noyau et du cytoplasme sous l'influence de l'oestradiol et de la prolactine.

De nombreux cas où l'abondance de la phosphatase alcaline du noyau varie parallèlement à la vitesse du "turnover" du P de l'acide thymonucléique ont été signalés (BRACHET ET JEENER¹) et l'hypothèse a été faite que la phosphatase jouerait un rôle dans le métabolisme de l'acide thymonucléique.

Il paraîtrait logique d'admettre que la phosphatase alcaline du cytoplasme pourrait

jouer un rôle analogue dans le métabolisme de l'acide ribonucléique. Comme ce corps paraît impliqué, d'une manière totalement inconnue encore, dans la synthèse des protéines, nous pourrions nous attendre à voir la teneur du cytoplasme en phosphatase augmenter lorsqu'une synthèse massive de protéines y est déclenchée et que de l'acide ribonucléique s'y accumule. C'est bien ce qui se passe dans le cas de la croissance de la muqueuse vaginale provoquée par l'œstradiol. Dans le cas de la croissance de l'utérus également, la phosphatase alcaline s'accumule dans le cytoplasme des cellules musculaires, bien que le phénomène soit surtout frappant en ce qui concerne la phosphatase alcaline des noyaux.

Toutefois, l'idée d'un lien entre l'abondance de la phosphatase alcaline, le métabolisme des acides nucléiques et la synthèse des protéines se heurte à des difficultés importantes. Nous avons vu en premier lieu que la croissance de la muqueuse du jabot de Pigeon sous l'influence de la prolactine ne s'accompagnait d'aucune augmentation de la teneur des cellules en phosphatases alcaline ou acide, bien que de l'acide ribonucléique s'y accumule en grandes quantités. D'autre part, ces cellules, où s'effectue une synthèse massive de protéines, sont très pauvres en phosphatases. Il en est de même pour les cellules exocrines du pancréas où s'effectue également une synthèse importante de protéines, où l'acide ribonucléique est particulièrement abondant (BRACHET¹⁵) et où ce corps manifeste un métabolisme intense lié au cycle sécrétoire (CASPERSSON¹⁸).

Il semble donc que la remarquable augmentation de la teneur en phosphatase alcaline du vagin et de l'utérus sous l'influence de l'œstradiol doive trouver une autre explication.

Nous pourrions songer à la chercher dans l'action spécifique qu'exerceraient divers corps stéroïdes ou corps voisins sur les phosphatases en rapprochant l'influence de l'œstradiol sur la phosphatase alcaline du vagin et de l'utérus de celle des substances androgènes sur la phosphatase acide de la prostate (GUTMAN¹⁹), du méthylcholanthrène sur la phosphatase des cellules basales de l'épiderme de la Souris (BIESELE²⁰), d'extraits du cortex surrénal sur la phosphatase alcaline du foie (Kochakian²¹).

Une telle hypothèse rendrait compte de ce que la croissance du vagin et de l'utérus est accompagnée d'une accumulation de phosphatases, alors que la croissance du jabot de Pigeon, provoquée par une hormone protéique, ne l'est pas.

Une autre possibilité d'interprétation nous est fournie par l'hypothèse de DANIELLI²², suivant laquelle l'accumulation des phosphatases pourrait être, dans de nombreux cas (plaies cutanées en régénération, cellules basales des poils par exemple), en relation avec la synthèse de protéines fibreuses.

Nous voyons, en effet, qu'une augmentation de la phosphatase alcaline se produit dans la muqueuse vaginale où se manifeste une synthèse abondante de kératine, dans la musculature circulaire de l'utérus où nous avons toutes raisons de croire que s'effectue une synthèse de myosine, c'est-à-dire précisément là où s'accumulent des protéines fibreuses typiques. Au contraire, dans le jabot où rien n'indique la synthèse de kératine, de collagène, de myosine, ainsi que dans le pancréas, où ne sont certainement pas synthétisées des protéines de ce groupe, les phosphatases sont très peu abondantes et, dans le cas du jabot, le restent au moment de la croissance.

L'idée d'une relation entre l'abondance des phosphatases et la vitesse de synthèse des protéines fibreuses seules ne trouve évidemment aucune justification sur le plan biochimique, car il est bien difficile d'imaginer que les protéines globulaires seraient synthétisées par un mécanisme différent. N'oubliions pas cependant que le rôle des

phosphatases dans cette synthèse reste fort mystérieux et contentons-nous d'enregistrer le fait que l'étude de divers processus de croissance provoqués par des hormones a fait surgir incontestablement des arguments nouveaux en faveur de l'hypothèse de DANIELLI.

RÉSUMÉ

La synthèse massive de protéines provoquée par l'oestradiol dans le vagin et l'utérus de la Souris castrée s'accompagne d'une accumulation d'acide ribonucléique et de phosphomonoestérase alcaline dans cet organe.

La synthèse également rapide des protéines par la muqueuse du jabot de Pigeon sous l'influence de la prolactine n'entraîne que le premier de ces phénomènes, la teneur en phosphomonoestérase alcaline restant à tout moment très basse. De même, la teneur en phosphomonoestérase alcaline du pancréas est faible, bien que cet organe soit le lieu d'une synthèse active de protéines.

Il existe un rapport constant entre les quantités de protéines et d'acide ribonucléique synthétisées au début de la croissance. Parce qu'il n'existe pas dans le cas de l'acide thymonucléique.

L'accumulation de phosphomonoestérase alcaline dans le vagin et l'utérus en croissance pourrait être liée à la synthèse de protéines fibreuses que le jabot et le pancréas ne produisent pas.

SUMMARY

The considerable synthesis of proteins occurring in the vagina and uterus of castrated Mice as a result of oestradiol injection, is accompanied by an accumulation of ribonucleic acid and alkaline phosphomonoesterase in these organs.

The equally rapid protein synthesis in the mucosa of the gizzard of pigeons treated with prolactin is accompanied by the first phenomenon only; the amount of alkaline phosphomonoesterase present remains very low during the whole process. Pancreas also contains but little alkaline phosphomonoesterase although a very active synthesis of proteins takes place in this organ.

There is a constant relation between the amounts of proteins and ribonucleic acid formed during the first stages of growth. No such relation exists for desoxyribosenucleic acid.

The accumulation of alkaline phosphomonoesterase in growing vagina and uterus might bear relation to the formation of fibrous proteins that are not synthesised by the gizzard gland or pancreas.

ZUSAMMENFASSUNG

Die bedeutende Eiweisssynthese, die durch Oestradiol in der Vagina und dem Uterus kastrierter Mäuse hervorgerufen wird, wird von der Anhäufung von Ribonukleinsäure und alkalischer Phosphomonoesterase in diesen Organen begleitet.

Die ebensoschnelle Eiweissynthese in der Schleimhaut des Taubenkropfes unter dem Einfluss von Prolactin wird nur von der ersten dieser Erscheinungen begleitet; der Gehalt an alkalischer Phosphomonoesterase bleibt die ganze Zeit sehr niedrig. Ebenso ist der Gehalt der Pankreas an alkalischer Phosphomonoesterase gering, während dieses Organ der Ort einer aktiven Eiweissynthese ist.

Es besteht ein Zusammenhang zwischen den im Beginn des Wachstums synthetisierten Eiweiss- und Ribonukleinsäuremengen. Eine derartige Beziehung besteht nicht für die Thymonukleinsäure.

Die Anhäufung der alkalischen Phosphomonoestcrase in Vagina und Uterus während des Wachstums könnte mit der Synthese faseriger Eiweisskörper zusammenhängen, die Kropf und Pankreas nicht produzieren.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BRACHET ET R. JEENER, *Compt. rend. soc. biol.*, 140 (1946) 1121.
- ² W. V. GARDNER ET C. W. TURNER, *Mo. Agy. Exp. Sta., Research Bull.*, 195 (1933) 5.
- ³ H. B. FELL ET J. F. DANIELLI, *Brit. J. Exp. Path.*, 24 (1943) 196.
- ⁴ I. BERENBLUM ET E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 286.
- ⁵ W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 293.
- ⁶ R. MARKHAM, *Biochem. J.*, 36 (1942) 790.
- ⁷ F. G. FISHER, I. BÖTTGER ET H. LEHMANN-ECHTERNACHT, *Z. physiol. Chem.*, 271 (1942) 246.
- ⁸ M. CHÈVREMONT ET J. FRÉDERIC, *Arch. biol. (Liège)*, 54 (1943) 589.
- ⁹ H. CHANTRENNE, *Bull. soc. chim. Belg.*, 55 (1946) 5.
- ¹⁰ E. ALLEN, G. M. SMITH ET W. V. GARDNER, *Am. J. Anat.*, 61 (1937) 321.

- 11 W. B. ATKINSON ET H. ELFMAN, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 62 (1946) 148.
- 12 E. J. KRUGELIS, *Genetics*, 31 (1946) 221.
- 13 F. JACOBY, *Nature*, 158 (1946) 268.
- 14 H. G. EHRENSVÄRD, *Z. physiol. Chem.*, 217 (1933) 274.
- 15 J. BRACHET, *Arch. biol. (Liège)*, 53 (1941) 207.
- 16 J. BRACHET ET R. JEENER, *Enzymologia*, 11 (1944) 196.
- 17 B. THORELL, Studies on the formation of cellular substances during blood cell production, H. Kimpton, London (1947).
- 18 T. CASPERSSON, H. LANDSTRÖM-HYDÉN ET L. AQUILONIUS, *Chromosoma*, 2 (1941) 111.
- 19 A. GUTMAN ET E. GUTMAN, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 41 (1939) 277.
- 20 J. BIESELE ET M. BIESELE, *Cancer Research*, 4 (1944) 751.
- 21 C. D. KOCHAKIAN, *Rec. Progr. Hormone Res.*, 1 (1947) 177.
- 22 J. F. DANIELLI, *J. Exp. Biol.*, 22 (1946) 110.
- 23 M. DESClin, *Compt. rend. soc. biol.*, 123 (1940) 457.
- 24 M. HERLANT, *Arch. biol.*, 54 (1943) 225.

Reçu le 14 juin 1948