

MÉTABOLISME DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DANS L'ŒUF D'AMPHIBIEN TRAITÉ AU DINITROPHÉNOL

par

M. STEINERT

Laboratoire de Morphologie Animale, Université libre de Bruxelles (Belgique)

Des observations histologiques et histoquímiques de BRACHET¹ ont montré que la répartition des acides ribonucléiques est fortement altérée dans les embryons de batraciens soumis à l'action du dinitrophénol (DNP) ou de l'usnate. BRACHET a fait un rapprochement intéressant entre l'aspect des œufs bloqués par ces inhibiteurs des phosphorylations oxydatives et celui des hybrides létaux et il a émis l'hypothèse que les noyaux interviendraient dans le couplage des oxydations et des phosphorylations de l'embryon.

Le présent travail a comme but de compléter les observations de BRACHET par une étude quantitative du métabolisme des acides nucléiques dans des embryons cultivés en présence de dinitrophénol ou d'usnate.

MATÉRIEL

Nos expériences ont porté sur des œufs des espèces suivantes: *Rana fusca*, *Rana esculenta*, *Triton waltlii* (Pleurodèle), *Ambystoma mexicanum*.

TECHNIQUES

Le dinitrophénol (Chemipharma) et l'usnate sont dissous dans du liquide de Holtfreter et le pH est soigneusement ramené à la neutralité. Les solutions d'usnate sont préparées immédiatement avant l'emploi, à partir d'un produit recristallisé. Les œufs sont débarassés de leurs enveloppes muqueuses pour faciliter la pénétration des poisons des phosphorylations; ils sont ensuite plongés dans des solutions d'usnate ou de dinitrophénol pendant des temps variés, le plus généralement 24 ou 48 heures. Les œufs sont ensuite lavés avec du liquide de Holtfreter 1/10 et gardés dans des boîtes de Petri contenant du Holtfreter 1/10. Les cultures sont maintenues à la température de 16° C, pendant toute la durée de l'expérience.

Dosage de l'acide ribonucléique. Les dosages de l'acide ribonucléique sont réalisés par la technique spectrophotométrique décrite précédemment (STEINERT²). Chaque œuf est extrait séparément par 0.5 ml d'acide perchlorique 1 %. L'extinction au maximum (260 mμ) de l'extrait est comprise entre 0.3 et 0.9, ce qui correspond aux meilleures conditions de travail avec le spectrophotomètre de Beckman.

Dosage des bases puriques libres. Des extraits à l'acide perchlorique 1 % sont obtenus à partir de 15 œufs à la fois, dans les conditions déjà décrites (STEINERT³). La séparation des bases par chromatographie sur papier se fait au moyen du solvant propanol/ammoniaque/eau, qui nous a donné de bons résultats³.

Mesures de la consommation d'oxygène. Nous utilisons le procédé classique de Warburg. On place, dans chaque récipient des manomètres, de 100 à 125 œufs débarassés de leurs enveloppes muqueuses, dans le plus petit volume possible de solution Holtfreter 1/10. Le dinitrophénol est déposé en solution concentrée dans la fiole latérale de façon à obtenir, après le mélange, les concentrations de $5 \cdot 10^{-5} M$ et de $5 \cdot 10^{-4} M$. Le dinitrophénol n'est mélangé aux œufs qu'après le temps nécessaire à l'équilibration thermique des manomètres. Le thermostat est maintenu à 22° C. Les lectures sont faites de 15 en 15 minutes, pendant 6 heures.

Bibliographie p. 431.

RÉSULTATS

Il ne semble pas y avoir de différences importantes dans la sensibilité au dinitrophénol des différentes espèces étudiées. Le dinitrophénol bloque complètement le développement des œufs à partir de la concentration de $5 \cdot 10^{-5} M$. L'effet est immédiat et réversible si les embryons sont lavés et reportés dans du liquide de Holtfreter pur après 24 ou 48 heures. Cette réversibilité s'observe même si la concentration en dinitrophénol est dix fois supérieure ($5 \cdot 10^{-4} M$). Le développement des embryons reportés dans le Holtfreter après l'action du toxique n'est cependant jamais normal: la gastrulation n'est pas complète et il subsiste un bouchon vitellin plus ou moins important, comme l'avait déjà décrit DAWSON⁴. La microcéphalie et des déformations de la région caudale sont les altérations les plus fréquentes que provoque le dinitrophénol.

L'usnate ne bloque pas aussi parfaitement le développement des embryons (chez le Pleurodèle) que le dinitrophénol. A la dilution de $0.5 \gamma/ml$, il ne ralentit même pas la croissance de l'embryon; 1γ à $2\gamma/ml$ sont nécessaires pour obtenir un effet important. Le blastopore apparaît cependant toujours chez les blastulas traitées et une gastrulation partielle est fréquente. Même des blastulas traitées par de l'usnate à $4\gamma/ml$, qui provoque la cytolysse totale en moins de 48 heures, peuvent former un blastopore. La réversibilité des troubles produits par l'usnate n'est pas aussi complète que dans le cas du dinitrophénol.

Acide ribonucléique. Conformément aux observations histochimiques de BRACHET¹, nous avons observé que l'usnate et le dinitrophénol causent des troubles considérables dans le métabolisme de l'acide ribonucléique. On note, chez les embryons traités au dinitrophénol, un parallélisme étroit entre le degré de développement atteint et la synthèse de l'acide ribonucléique. Celle-ci est totalement inhibée par le dinitrophénol $2 \cdot 10^{-5} M$. Lorsque des embryons traités au dinitrophénol sont remis dans du liquide de Holtfreter pur, la synthèse de l'acide ribonucléique recommence au moment précis où la croissance reprend. Nous avons aussi toujours pu constater que ce sont les embryons les plus riches en acide ribonucléique qui sont les moins anormaux et les mieux développés (Tableau I).

TABLEAU I

BALSTULAS DE PLEURODÈLE, MISES DANS LE DNP PENDANT 24 HEURES,
REPORTÉES ENSUITE DANS DU HOLTFRÉTER PUR

	Au début de l'expérience	Après deux jours	Après trois jours
Témoin			
DNP $5 \cdot 10^{-5} M$	5.31γ ARN par embryon	6.08γ $s = 0.38$	8.23γ $s = 0.49$
DNP $5 \cdot 10^{-4} M$	$s = 0.09$	5.20γ $s = 0.22$ 5.33γ $s = 0.16$	6.12γ $s = 0.61$ 5.99γ $s = 0.18$

s = Standard deviation.

Des observations analogues ont été faites sur des œufs traités à l'usnate. A la dilution de $1-2\gamma/ml$, l'usnate bloque la synthèse de l'acide ribonucléique, quoiqu'il n'empêche pas totalement la gastrulation comme le fait le dinitrophénol (Tableau II).

Bases puriques libres. Seule l'action du dinitrophénol a été étudiée chez *Rana fusca*. L'augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires, due à la précytolysé des embryons, entraîne la perte rapide des bases libres. Il faut donc prendre grand soin de

TABLEAU II
BALSTULAS DE PLEURODÈLE, MISES DANS L'USNATE PENDANT 48 HEURES,
REPORTÉES ENSUITE DANS DU HOLTGRETER PUR

	<i>Au début de l'expérience</i>	<i>Après 24 heures</i>	<i>Après deux jours</i>	<i>Après trois jours</i>	<i>Après quatre jours</i>
Témoins					
Usnate 1 γ/ml	6.07γ ARN plr embryon $s = 0.31$	—	7.24γ $s = 0.49$ 6.16γ $s = 0.14$	8.48γ $s = 0.47$ 5.85γ $s = 0.59$	9.59γ $s = 0.32$ 6.46γ $s = 1.28$
Usnate 2 γ/ml			—	5.71γ $s = 0.18$	—
Usnate 4 γ/ml		5.95γ $s = 0.34$		cytolyse totale	5.31γ $s = 0.36$

s = Standard deviation.

n'utiliser pour le dosage des purines libres que des œufs absolument intacts. Nous avons montré que, dans l'œuf normal, les oxypurines libres disparaissent progressivement à partir de la gastrulation. Ce phénomène est fortement réduit lorsque l'œuf est soumis à l'action du dinitrophénol.

Voici, à titre d'exemple, les résultats de 4 expériences faites dans des conditions identiques (*s* représente la Standard deviation). Des gastrulas au stade 12 de SHUMWAY⁵, dont la teneur en oxypurines est de $37.4 \cdot 10^{-3}$ micromoles (*s* = 0.8) sont placés dans du dinitrophénol $5 \cdot 10^{-5} M$. Après 24 heures, les témoins sont au stade du bourgeon caudal (SHUMWAY 17) et les embryons traités au stade de la plaque médullaire (SHUMWAY 13, 14). Les premiers contiennent $29.8 \cdot 10^{-3}$ micromoles (*s* = 0.9) de bases libres, alors que les œufs soumis au dinitrophénol en ont encore $33.1 \cdot 10^{-3}$ micromole (*s* = 0.7).

Des observations semblables ont été faites sur des embryons à des stades plus avancés du développement et en employant d'autres concentrations de dinitrophénol.

Signalons encore une expérience analogue, où avons mesuré les changements de la teneur en bases libres de l'hybride létal *Rana fusca* ♂ × *Rana esculenta* ♀ et des témoins du même âge, *Rana esculenta* homozygote. Ces résultats sont réunis dans le Tableau III.

TABLEAU III
TENEUR EN BASES PURIQUES LIBRES DES OEUFS DE L'HYBRIDE LÉTAL
Rana fusca ♂ × *Rana esculenta* ♀

<i>Stade des témoins</i>	<i>Témoins</i>	<i>Hybrides</i>
Fécondation	$12.5 \cdot 10^{-3}$ micro <i>M</i>	—
Gastrula âgée	$11.8 \cdot 10^{-3}$ micro <i>M</i>	$12.6 \cdot 10^{-3}$ micro <i>M</i>
Neurula	$10.1 \cdot 10^{-3}$ micro <i>M</i>	$12.1 \cdot 10^{-3}$ micro <i>M</i>

Consommation d'oxygène. Comme le dinitro-*o*-crésol (BOELL, NEEDHAM ET ROGERS⁶), le dinitrophénol $5 \cdot 10^{-4} M$ augmente considérablement la respiration de blastulas ou de jeunes gastrulas. 2 ou 3 heures après avoir mélangé le dinitrophénol aux œufs, ceux-ci consomment plus de deux fois plus d'oxygène que les témoins (Fig. I). La respiration tend ensuite à diminuer et elle cesse totalement après quelques heures. A une concentration dix fois plus faible, le dinitrophénol augmente encore sensiblement la respiration d'une façon progressive et continue, pendant au moins 7 heures. Les résultats varient d'ailleurs dans de très fortes proportions d'une ponte à l'autre de *Rana fusca*.

Notons encore que les œufs dont le développement est bloqué par le dinitrophénol sont moins sujets à la cytolyse lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions favorables à une meilleure oxygénéation du milieu.

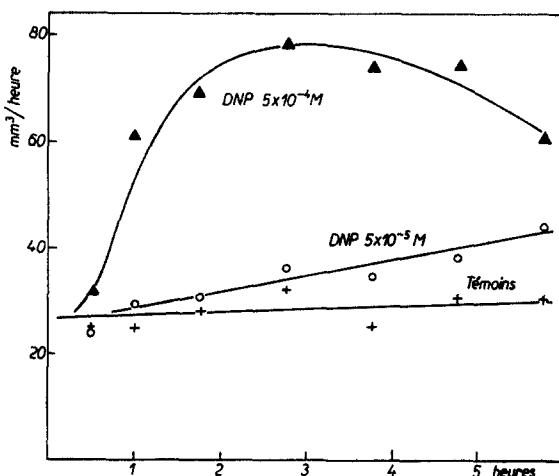
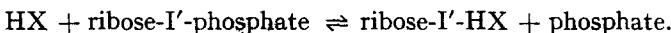


Fig. 1. Consommation d'oxygène pour 100 embryons, normaux ou traités au dinitrophénol (DNP) $5 \cdot 10^{-4} M$ et $5 \cdot 10^{-5} M$. En abscisse: le temps après le mélange du DNP aux embryons.

DISCUSSION

On remarquera tout d'abord que les blastulas traitées à l'usnate sont capables d'amorcer la gastrulation bien que la synthèse de l'acide ribonucléique soit complètement bloquée. A ce point de vue, il semble d'ailleurs y avoir une nette différence entre le mode d'action de chacun des deux poisons utilisés: on peut cultiver des œufs dans du dinitrophénol à une concentration beaucoup plus élevée que celle qui bloque le développement sans produire de cytolysé de l'œuf avant deux ou trois jours; par contre, le blocage réversible sans cytolysé ne peut être obtenu avec l'usnate que dans des limites de concentration très étroites.

La synthèse des nucléotides et des nucléosides requiert l'intervention d'esters phosphoriques (KALCKAR et coll.⁷); on pouvait donc s'attendre à trouver une inhibition de la synthèse de l'acide ribonucléique chez les embryons traités par un poison des phosphorylations oxydatives. Selon KALCKAR, la synthèse du lien ribosidique ou désoxyribosidique est réalisée par la nucléoside-phosphorylase suivant l'équation



Le dinitrophénol bloquerait la synthèse du ribose-I'-phosphate et, secondairement, l'utilisation de l'hypoxanthine ou de la guanine. C'est effectivement ce que nous constatons dans le cas de l'embryon de grenouille traité au dinitrophénol: la disparition des bases libres est fortement inhibée par le dinitrophénol. Ce fait semble bien confirmer l'idée que ces bases interviendraient dans la synthèse des nucléotides de l'embryon⁸. Une autre voie possible du métabolisme des bases puriques est leur dégradation en acide urique, par le mécanisme de la xanthine-oxydase. On ignore encore si le dinitrophénol inhibe l'activité de cet enzyme, mais il semble peu probable qu'il en soit ainsi à la concentration de $5 \cdot 10^{-5} M$. L'oxydation de l'hypoxanthine en acide urique n'implique pas l'intervention d'esters phosphoriques. Il est d'ailleurs peu vraisemblable que l'oxydation de l'hypoxanthine soit bloquée dans un organisme dont la consommation d'oxygène est fortement accrue par le dinitrophénol. Enfin, il est à remarquer que l'effet toxique du

dinitrophénol sur la synthèse de l'acide ribonucléique et sur le métabolisme des bases puriques s'obtient à la concentration qui inhibe les phosphorylations (LOOMIS ET LIPMANN, JUDAH ET WILLIAMS ASHMAN, TEPLY⁸), alors que ce n'est qu'à une concentration beaucoup plus élevée que le dinitrophénol bloque les oxydations.

Les dosages des purines libres dans les œufs de l'hybride létal *Rana fusca* ♂ × *Rana esculenta* ♀ montrent qu'il s'y produit des phénomènes semblables à ceux qui viennent d'être décrits dans le cas du dinitrophénol. Les hybrides bloqués gardent intactes leurs bases puriques libres tant qu'ils ne se cytolysent pas, alors que les œufs témoins (*R. esculenta* homozygote) perdent progressivement leur réserve d'hypoxanthine et de guanine. Nous savons, d'autre part, que la synthèse de l'acide ribonucléique est fortement inhibée chez l'hybride aussi (STEINERT²). Cette analogie entre les effets de l'hybridation et ceux de l'action du dinitrophénol, déjà signalée par BRACHET¹, apporte un nouvel appui à l'hypothèse de cet auteur qui attribue au noyau un rôle dans l'élaboration de coenzymes nécessaires au couplage entre les oxydations et les phosphorylations.

RÉSUMÉ

1. Le DNP et l'usnate bloquent la synthèse de l'acide ribonucléique dans l'œuf de Batracien.
2. Dans les embryons traités au DNP, la disparition progressive des bases puriques libres est inhibée.
3. La consommation d' O_2 des œufs traités au DNP est accrue dans de fortes proportions par rapport à celle des témoins.
4. Ces observations appuient l'hypothèse de BRACHET relative au rôle du noyau dans le couplage des oxydations et des phosphorylations.

SUMMARY

1. The synthesis of ribonucleic acid in the eggs of Batrachians is inhibited by DNP and usnate.
2. The progressive decrease in the amount of free purine bases is not observed when the embryos are treated with DNP.
3. The O_2 consumption of DNP-treated eggs is much increased compared with that of normal eggs.
4. These observations confirm BRACHET's hypothesis as to the role of the nucleus in the linkage of oxidations and oxidative phosphorylations.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Synthese der Ribonukleinsäure in Froscheiern wird von Dinitrophenol und Usnat verhindert.
2. Das fortschreitende Verschwinden der freien Purinbasen ist in mit Dinitrophenol behandelten Embryonen gehemmt.
3. Der Sauerstoffverbrauch von mit Dinitrophenol behandelten Eiern hat im Vergleich mit den normalen Eiern stark zugenommen.
4. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese von BRACHET bezüglich der Rolle des Kerns bei der Verknüpfung oxydierender und phosphorylierender Vorgänge.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BRACHET, *Experientia*, 7 (1951) 344; *La rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon. Actualités Biochimiques*, No. 16, Desoer, Liège, 1952.
- ² M. STEINERT, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 549.
- ³ M. STEINERT, *Experientia*, 7 (1951) 342; *Bull. soc. chim. biol.*, sous presse.
- ⁴ A. B. DAWSON, *J. Exptl Zool.*, 78 (1938) 101.
- ⁵ SHUMWAY, *Anat. Rec.*, 78 (1940) 138.
- ⁶ E. J. BOELL, J. NEEDHAM ET V. ROGERS, *Proc. Roy. Soc. London*, 127 (1939) 322.
- ⁷ H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 477;
M. FRIEDKIN ET H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 437.
- ⁸ W. F. LOOMIS ET F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 807;
L. J. TEPLY, *Arch. Biochem.*, 24 (1949) 383;
J. D. JUDAH ET H. G. WILLIAMS ASHMAN, *Biol. J.*, 48 (1951) 33.

Reçu le 20 octobre 1952