

## ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR LA FORMATION DES CHLOROPLASTES

par

M. DE DEKEN-GRENSON

*Laboratoire de Physiologie animale, Université libre de Bruxelles (Belgique)*

### INTRODUCTION

On sait que les plantes supérieures (VON EULER<sup>1</sup>) et certains flagellates verts (PROVASOLI, HUTNER ET SCHATZ<sup>2</sup>) ne synthétisent pas de chlorophylle lorsqu'ils sont cultivés en présence de streptomycine (Sm), et on a de bonnes raisons de penser que ce n'est pas seulement la formation de la chlorophylle, mais le développement du chloroplaste tout entier qui est inhibé par cet antibiotique (BRACCO ET VON EULER<sup>3</sup>; PROVASOLI, HUTNER ET PINTER<sup>4</sup>).

A la suite de ces observations, certains auteurs ont considéré que la Sm induisait, chez ces végétaux, la perte irréversible des chloroplastes: "Sm cures plants of their chloroplasts" (voir revue générale de la question par PROVASOLI *et al.*<sup>4</sup>).

Cette "altération du patrimoine héréditaire" était-elle produite par la mutation de gènes nucléaires ou par l'élimination d'unités cytoplasmiques douées de continuité génétique, telle était la question fondamentale posée par ces auteurs.

Les expériences que nous rapportons ici, et dont certaines ont fait l'objet d'une note préliminaire<sup>5</sup>, ont pour but d'examiner si l'on peut réellement attribuer à la Sm le pouvoir d'altérer le patrimoine héréditaire des végétaux et de préciser les modalités de l'action de cet antibiotique sur la formation des chloroplastes.

### MATERIEL ET METHODES

#### *Conditions de culture*

Les expériences ont toutes été réalisées sur des plantules d'orge, *Hordeum vulgare*, variété du Kenya.

Les graines sont disposées sur une couche de coton hydrophile mouillé, soit par de l'eau de ville, soit par de la solution nutritive de VICKERY<sup>6</sup>, dont la composition est la suivante:  $\text{CaCl}_2$ : 0.116 g,  $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ : 0.437 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 0.276 g, pour un litre d'eau. Le pH est ajusté à une valeur de 6.4 avec KOH. On a ajouté à cette solution 2.5 volumes pour cent d'un tampon de phosphates  $M/10$ , de pH 6.8.

L'eau de ville et la solution nutritive ont été additionnées de sulfate de streptomycine "Pfizer" à raison de 0.04 à 1.6 g pour 100 ml de solution.

La culture se fait à 25° C, sous un éclairage constant réalisé par des tubes à fluorescence.

#### *Dosage des pigments chlorophylliens*

Les plantules à étudier sont broyées dans de l'éthanol à 80% et le résidu est lavé plusieurs fois avec le même solvant, à basse température et à l'obscurité, de façon à extraire les pigments chlorophylliens. Ceux-ci sont estimés d'une manière globale, en unités arbitraires, par une colorimétrie réalisée à l'aide du spectrophotomètre Coleman, à 670 m $\mu$ , dans des tubes cylindriques de 1.8 cm de diamètre.

*Bibliographie p. 47.*

*Dosage des protéines et des acides ribonucléiques (ARN)*

Le culot de matériel cellulaire résultant de la précipitation alcoolique décrite au paragraphe précédent est délipidé suivant la méthode de SCHNEIDER<sup>7</sup>. Le résidu sec est minéralisé par l'acide sulfurique en présence du catalyseur de VENDRELY<sup>8</sup> et l'azote est dosé par la microméthode de KJELDAHL, grâce à l'appareil de MARKHAM. L'acide ribonucléique (ARN) a été dosé par la méthode de OGUR ET ROSEN<sup>9</sup>.

*Dosage global des composés aminés libres*

Un aliquot de l'extrait alcoolique contenant les chlorophylles est évaporé jusqu'à siccité; le résidu est repris dans un petit volume d'eau et agité en présence de chloroforme de manière à éliminer de l'extrait les chlorophylles, les lipides et les dernières traces de protéines. Le dosage des composés aminés est réalisé suivant la méthode de MOORE ET STEIN<sup>10</sup>.

*Mesure de l'activité respiratoire*

Les estimations ont été réalisées sur des broyats de feuilles, suivant la méthode de WARBURG, à 25° C et à l'abri de la lumière, dans les solutions suivantes:

1. une solution tampon de BONNER ET MILLER<sup>11</sup>, composée de saccharose (concentration finale 0.5 M) et d'un tampon de phosphates (concentration finale 0.02 M) de pH 7.2, en présence de 3 substrats différents: le glucose, le pyruvate et le succinate.

2. une solution physiologique de CHAMBERS<sup>12</sup> modifiée comme suit: KCl: 5.2 g, NaCl: 1.75 g, citrate de Na: 2.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0.2655 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ : 0.5433 g par litre de solution, le pH final étant de 7.16.

3. une solution physiologique composée de KCl: 1.15 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4(2\text{H}_2\text{O})$  1.78 g,  $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ : 0.0246 g pour un litre de solution, le pH final étant de 7.5.

*Dosage de l'amidon*

Une poudre sèche, délipidée, du tissu à étudier est soumise à un chauffage d'une heure à 100° C, dans une solution de NaOH 0.5 N. On neutralise l'extrait obtenu avec HCl concentré et on centrifuge pendant 10 minutes à 4,000 g. A 10 ml d'extrait, on ajoute 1 ml d'une solution à 1 g % d'iode et 3.2 g % d'iодure de potassium. Les mesures colorimétriques sont faites à l'aide d'un spectrophotomètre Coleman, à 550 m $\mu$ , le réactif à la même dilution étant utilisé comme témoin.

*Dosage de la cytochrome oxydase*

Il a été réalisé sur des broyats de feuilles, par la méthode de SCHNEIDER ET POTTER<sup>13</sup>.

*Dosage de la catalase*

Il a été réalisé par la méthode colorimétrique de PATTI ET BONET-MAURY<sup>14</sup>, sur des feuilles broyées dans un tampon de phosphates M/50, de pH 7.0, à 0° C.

Les essais de localisation de la catalase au sein du cytoplasme de feuilles vertes normales ont été faits après isolement des chloroplastes par centrifugation différentielle dans

1. une solution de saccharose 0.5 M (GRANICK<sup>15</sup>).

2. une solution de CHAMBERS (voir plus haut) dont le pH a été ajusté à 5.0.

3. une solution de CHAMBERS de pH 7.0.

## RÉSULTATS

*Réversibilité de l'action de la Sm sur les plantules d'orge**Expérience de base*

Les graines sont disposées dans des plats couverts de vitres, sur du coton hydrophile mouillé par une solution à 0.2 g de Sm pour 100 ml d'eau de ville. Au cours de la première journée de culture, les graines se gonflent d'eau; les radicelles apparaissent après 24 heures, le coléoptile après 48 heures environ. 72 heures après la mise en culture, les plantules ont atteint une longueur moyenne de 20 mm et sont parfaitement vertes. Il en est de même des témoins cultivés sans Sm. A ce moment, les plantules sont prélevées et repiquées sur de la terre exempte de Sm. Deux jours plus tard, on voit apparaître une région blanche à la base\* des plantules qui avaient été traitées par la Sm. Toutes les cellules nouvellement formées sont dès lors d'un blanc pur, exempts de toute

\* Notons que, chez les Graminées, le point de croissance des feuilles est localisé exclusivement à la base de la plante.

pigmentation (Fig. 1a). Il en va ainsi pendant de nombreux jours; puis, brusquement, en moyenne vers le 11<sup>ème</sup> jour suivant le repiquage, la zone en croissance de la base des plantules apparaît verte (Fig. 1b). Le phénomène est massif: toutes les plantules le présentent en l'espace de 3 à 4 jours. Cependant, les feuilles blanches ne verdiront jamais, quel que soit l'âge de la plante (Fig. 1b).

L'action inhibitrice de la Sm sur le développement des chloroplastes est donc *irréversible* pour les cellules qui se différencient complètement au cours de la période durant laquelle de la Sm est fournie à la plante, mais elle est *réversible* pour les cellules embryonnaires des régions méristématiques qui commencent leur différenciation alors que la Sm a été retirée du milieu de culture.

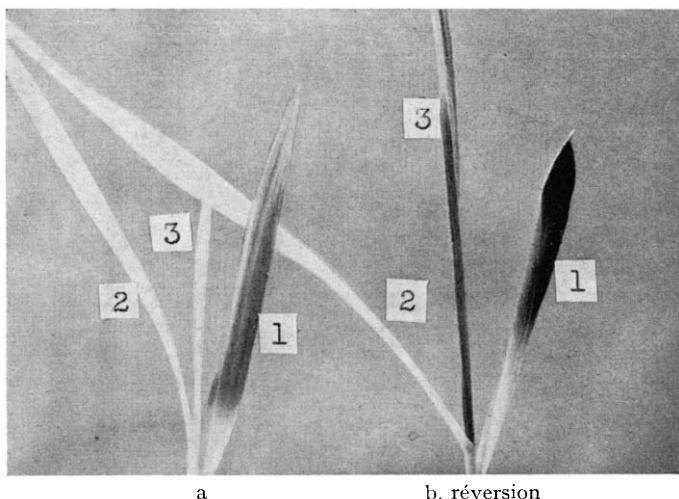


Fig. 1

NB. Les feuilles sont numérotées dans l'ordre de leur apparition.

#### Données complémentaires sur les caractéristiques de l'action de la Sm

1. *Moment de l'apparition de la réversion en fonction de la dose de Sm appliquée.* Les résultats obtenus en faisant varier la concentration de la solution de Sm utilisée et la durée d'application de l'antibiotique sont réunis dans le Tableau I. La zone verte succédant à une région définitivement blanche apparaît d'autant plus rapidement après le repiquage des plantules dans un milieu sans Sm que la dose appliquée a été plus faible.

TABLEAU I  
MOMENT D'APPARITION DE LA RÉVERSION (en jours suivant le semis)

Durée d'application de la SM	Concentration en SM du milieu de culture (en g de SM pour 100 ml)			
	0.02	0.2	0.4	1.0
1 jour	—	8e	—	—
2 jours	—	10e	—	—
3 jours	9e	14e	18e	28e
4 jours	—	18e	—	—
5 jours	10e	19e	22e	—

Notons que si on utilise une solution à 0.02 g de Sm pour 100 ml, 10% seulement des plantules présentent une lésion visible. Les autres sont entièrement vertes et leur aspect extérieur est parfaitement normal. Seuls les 10% de plantules à lésions blanches sont considérés au cours de cette série d'expériences.

2. *Pointe verte de la première feuille.* Ainsi qu'il a été dit plus haut, la première feuille qui apparaît présente une pointe verte. L'importance de celle-ci dépend de la concentration en Sm du milieu dans lequel s'est effectuée la germination. Le Tableau II présente quelques données numériques, moyennes obtenues sur des lots de 100 plantules chacun.

TABLEAU II

	Concentration en SM du milieu de culture (en g pour 100 ml)			
	0.2	0.4	0.8	1.6
Longueur moyenne de la pointe verte de la 1ère feuille au moment de la croissance de cette feuille (en mm)	20	12	5	0
id. 20 jours plus tard, la croissance étant arrêtée	lère feuille entière soit 60	18	10	5

La limite séparant la pointe verte de la région blanche de la première feuille n'est pas fixée définitivement. La région verte s'étend; gagnant sur la région blanche, elle progresse lentement vers la base de la feuille qu'elle atteint généralement au bout d'une vingtaine de jours dans le cas où les graines ont été traitées par une solution à 0.2% de Sm. Les données obtenues dans les autres cas sont notées dans le Tableau II. Insistons sur le fait que ceci ne concerne que la première feuille de la plantule: si les autres feuilles présentent une zone verte, elle est toujours de faible étendue (3 mm de long) et elle ne progresse pas aux dépens de la région blanche, qui demeure irréversiblement dépourvue de chloroplastes, ainsi qu'il a été dit plus haut.

3. *Absence de résistance à la Sm.* On pourrait penser que la réversion de l'action de la Sm que nous avons observée est due à l'apparition d'une résistance à l'antibiotique semblable à celle qui peut se manifester chez certaines bactéries. Cependant, les plantules ne présentent jamais le phénomène de reverdissement des régions en croissance tant qu'elles sont cultivées dans un milieu contenant de la Sm.

De plus, si on place à nouveau dans un milieu contenant 0.2 g de Sm pour 100 ml, des plantules ayant manifesté une réversion dans les conditions exposées plus haut (type b de la Fig. 1), il apparaît, environ 7 jours plus tard, une nouvelle zone blanche (Fig. 2), montrant que l'action de la Sm s'exerce toujours de la même manière.

4. *La Sm n'inhibe pas le verdissement des plantules étiolées.* Des graines d'orge ont été semées sur de la terre, à l'obscurité, de manière à produire des plantules étiolées parfaitement exemptes de chlorophylle. On sait que des plantes cultivées dans de telles conditions possèdent néanmoins des plastides sous la forme de leucoplastes, et qu'il suffit d'exposer les feuilles à la lumière pour les voir verdir en quelques heures.

L'expérience consiste à éclairer des feuilles de plantes étiolées dont la base plonge dans des solutions de Sm de concentrations variant de 0.2 à 2%. Nous n'avons pu mettre en évidence aucune inhibition du verdissement des feuilles étiolées, même lorsque nous

avons administré la Sm pendant des périodes atteignant 2 à 24 heures avant d'éclairer les feuilles.

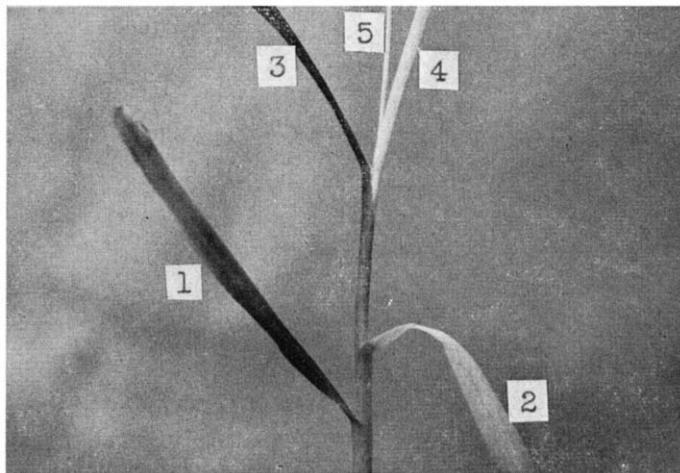


Fig. 2

Le verdissement n'est pas davantage inhibé lorsque la Sm est fournie aux feuilles étiolées sous la forme d'une solution à 0.2% infiltrée par la voie des stomates dans les espaces intercellulaires, après avoir réalisé le vide d'air.

#### *Action spécifique de la Sm sur les précurseurs des plastes*

Nous avons suivi le sort de différents constituants cellulaires appartenant, les uns, aux chloroplastes, les autres, au cytoplasme, dans des plantules traitées par des solutions de Sm de différentes concentrations.

Les résultats réunis dans le Tableau III ont été obtenus au cours d'une première expérience, dans laquelle les plantules ont été cultivées dans une solution nutritive de VICKERY<sup>6</sup>.

Au cours d'une seconde expérience, les plantules ont été cultivées sur de l'eau de ville, disposant ainsi exclusivement des réserves de la graine. Les plantules traitées par la Sm, possédant une région blanche plus ou moins étendue suivant la concentration en Sm utilisée, sont défavorisées par rapport aux témoins du simple point de vue de la photosynthèse. Dans le but d'éliminer ce facteur supplémentaire de variation, nous avons doublé l'expérience d'une expérience identique effectuée à l'abri de la lumière. Les résultats sont réunis dans le Tableau IV.

Ces résultats ont été complétés par une troisième expérience : une série de plantules ayant germé sur une solution de Sm à 0.2% ont été repiquées sur de la terre après 6 jours. Ceci permet de cultiver ces plantules pendant un temps beaucoup plus long. Malgré l'absence de Sm, les plantes restent blanches pendant le temps que dure l'expérience, exception faite, évidemment, de la pointe verte de la première feuille, apparue avant que la Sm n'atteigne la concentration intracellulaire seuil capable de bloquer complètement la formation des chloroplastes (voir plus haut). Au 24ème jour suivant la germination, les plantules sont prélevées et découpées de façon à former deux lots, l'un renfermant les pointes vertes, l'autre, les régions blanches. Ces deux lots ont été traités comme plus haut. Les résultats sont réunis dans le Tableau V.

TABLEAU III

Concentration du milieus de culture en SM (en g./100 ml.)	Hauteur moyenne des plantules au moment de l'expérience (en mm.)	Longueur moyenne de la pointe verte de la 1 <sup>re</sup> feuille (en mm.)	Poids sec d'une plantule (résidu délipidé) (en mg.)	Quantité de protéines (en mg. par g. de poids sec)	Quantité de chlorophylle (unités arbitraires par g. de poids sec)	Quantité d'acides aminés libres (en $\mu$ l. par g. de poids sec)	Quantité d'ARN (en mg. par g. de poids sec)	Quantité d'amidon (en mg. par g. de poids sec)
Témoins sans SM	120	120	6.3	227.5	11.634	312	24.0	10.81
SM 0.04%	100	55	5.1	211.2	4.700	473	26.1	10.25
SM 0.20%	70	50	3.9	213.7	1.400	1.032	25.2	1.2.18
SM 0.50%	60	6	2.2	221.8	—	1.686	25.8	1.3.12

Les mesures ont été réalisées sur des lots de 300 plantules, au 8ème jour suivant le semis.

TABLE IV

Concentration de culture en SM (en g. 10 ml)	Hauteur moyenne des plantules du milieu au moment de l'expérience (en mm)	Longueur moyenne de la pointe verte de la tige tendre (en mm)	Poids sec d'une plantule (reste défilé) (en mg)	Quantité de protéines (en mg par g de poids sec)	Quantité d'acides aminés libres (en $\mu$ M par g de poids sec)	Quantité d'ARN (en mg par g de poids sec)	Quantité d'amidon (en mg par g de poids sec)
Témoins sans SM	75	75	4.2	325	16.510	410	35.2
SM 0.04%	70	60	3.8	313	6.078	800	36.5
SM 0.20%	60	20	2.7	303	3.747	1.260	30.3
Lumière				Obscurité			
Témoins sans SM	100	—	—	3.7	268	—	1.000
SM 0.04%	100	—	—	2.0	256	—	1.210
SM 0.20%	80	—	—	0.6	249	—	1.500
Témoins sans SM				Témoins sans SM			
SM 0.04%	—	—	—	—	—	—	34.4
SM 0.20%	—	—	—	—	—	—	30.3

Les mesures ont été réalisées sur des lots de 300 plantules, au 6ème jour suivant le semis.

TABLEAU V

	Quantité de protéines (en mg par g de poids sec)	Quantité d'acides aminés libres (en $\mu$ M par g de poids sec)	Quantité d'ARN (en mg par g de poids sec)
Pointes vertes	233	582	17.4
Régions blanches	352	2,696	18.5

*Etat du système respiratoire*

Nous avons comparé l'activité respiratoire de plantules vertes normales à celle des régions blanches de plantules ayant crû sur une solution à 0.2% de Sm. Les mesures ont été effectuées dans le milieu de BONNER ET MILLERD<sup>11</sup>, en présence des substrats suivants: glucose, pyruvate et succinate. Les résultats sont notés dans le Tableau VI. Il en ressort que l'appareil respiratoire des régions blanches n'est nullement atteint: la teneur en mitochondries serait normale, dans des cellules appauvries en d'autres constituants, à savoir les plastes.

TABLEAU VI

Substrat	$Q_{O_2}$ des feuilles vertes	$Q_{O_2}$ des feuilles blanches/SM	Rapport des $Q_{O_2}$ feuilles blanches/ feuilles vertes
Glucose	2.14	3.6	168/100
Pyruvate	2.04	3.6	176/100
Succinate	0.82	1.9	231/100

*Dosage d'un enzyme caractéristique des chloroplastes: la polyphénoloxydase*

On sait que la polyphénoloxydase est souvent liée aux chloroplastes (LI ET BONNER<sup>16</sup>; ARNON<sup>17</sup>; LATIES<sup>18</sup>). Il en est ainsi dans le cas de l'orge où nous avons pu la mettre en évidence par la réaction du Nadi sur des coupes de tissu frais. Dans les plantules vertes, la réaction est intense et semble localisée exclusivement au niveau des chloroplastes. Par contre, nous n'avons pu déceler de réaction positive dans le cas des parties blanches des plantules traitées par la Sm.

D'autre part, il semble que, si la polyphénoloxydase et la cytochrome oxydase ne sont pas identiques, le cytochrome *c* réduit chimiquement peut, en tous cas, leur servir de substrat à toutes deux.

Nous avons mesuré l'activité globale d'oxydation du cytochrome *c* dans des plantules vertes normales, des plantules étiolées par une croissance à l'obscurité et des plantules blanches traitées par la Sm. La Fig. 3 montre que la teneur en "cytochrome oxydase" des plantules étiolées et des plantules blanches du fait de la Sm n'atteint que la moitié environ de celle des témoins verts, valeur qui pourrait correspondre à la teneur en cytochrome oxydase vraie de ces tissus dépourvus de polyphénoloxydase.

*Dosage de la catalase*

L'activité catalasique a également été dosée dans des plantules vertes normales, des plantules étiolées et des plantules blanches traitées par la Sm. Les résultats sont résumés dans la Fig. 3. Ils montrent que l'activité catalasique par unité de poids de protéines n'atteint, chez les plantules étiolées, que 60% de la teneur normale des feuilles

vertes et, chez les plantules blanches traitées par la Sm, des teneurs se situant entre 23 et 10% de la normale.

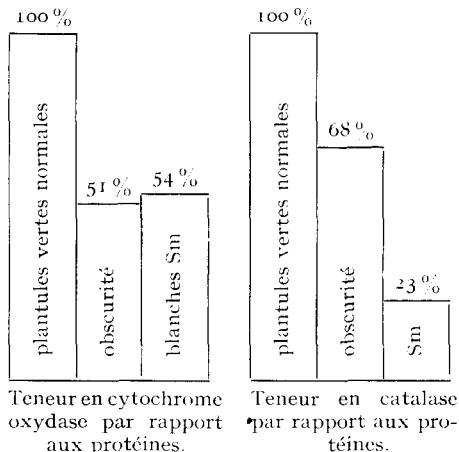


Fig. 3

CHAMBERS de pH 5, 40% seulement de l'activité catalasique totale se retrouve dans le liquide surnageant et 60% se retrouvent dans la fraction chloroplastique. Par contre, dans la même solution de CHAMBERS, mais portée, cette fois à pH 7, on retrouve 75% de la catalase dans le liquide surnageant et 25% dans la fraction chloroplastique.

#### Action de la Sm sur la respiration des plantules d'orge

Une série d'expériences ont été réalisées dans le but de tester l'action de la Sm sur la respiration des plantules d'orge afin d'examiner si un blocage de la fourniture d'énergie pourrait être la cause de l'inhibition de la différenciation des plastes, comme cela semble être le cas pour l'inhibition de la croissance chez *E. coli* (UMBREIT<sup>20</sup>).

Ces expériences ont consisté à mesurer l'absorption d'oxygène d'un broyat de plantes étiolées, auquel on a, ou non, ajouté de la Sm de façon à atteindre une concentration finale de 0.2 ou 1.0 g de Sm pour 100 ml. Les résultats sont résumés dans le Tableau VII. Dans les différentes conditions étudiées, il ne semble pas que la Sm, même utilisée à la forte dose de 1%, exerce une inhibition significative sur la respiration des plantules d'orge.

TABLEAU VII

Milieu	Substrat	$Q_{O_2}$ normal	$Q_{O_2}$ en présence de SM à 0.2 g%	$Q_{O_2}$ en présence de SM à 1%
BONNER <sup>11</sup>	glucose	3.3	3.5	—
BONNER <sup>11</sup>	pyruvate	3.9	3.3	—
BONNER <sup>11</sup>	succinate	1.6	1.6	—
CHAMBERS <sup>12</sup>	—	1.7	1.8	1.8
CHAMBERS <sup>12</sup>	—	2.5	2.7	2.7

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Il semble découler de la première partie de ce travail que la Sm n'a pas le pouvoir d'altérer le patrimoine héréditaire des plantes, ainsi qu'on pouvait le supposer.

Parmi les cellules de la plantule, qui, toutes, ont été soumises à l'action de la Sm, il

en est qui ont perdu leurs plastes irréversiblement (feuilles définitivement blanches) ; mais les cellules embryonnaires sont encore capables de donner naissance à des cellules vertes. Dans les cellules embryonnaires, la Sm n'a donc détruit aucun des facteurs assurant la continuité génétique des plastides, qu'ils soient de nature nucléaire ou cytoplasmique.

Comment concevoir, dès lors, l'action de la Sm ?

On sait que, chez les plantes supérieures, les chloroplastes sont issus des proplastides, petites particules incolores qui se multiplient dans les cellules méristématiques, puis, se mettent à croître, entamant le cycle de leur différenciation qui les transformera finalement en chloroplastes à quelque distance de là (RANDOLPH<sup>21</sup>; STRUGGER<sup>22</sup>). Or, ces proplastides semblent détenir une part importante des facteurs assurant la continuité génétique des plastes (MICHAELIS<sup>23</sup>), qui, on le sait, jouissent d'une large autonomie vis-à-vis des gènes nucléaires.

Nos résultats impliquent donc que la Sm n'interrompt pas la production des proplastides.

*Tout se passe comme si, tant que les proplastides se multiplient, ils ne sont pas sensibles à la Sm, mais le deviennent dès qu'ils cessent de se multiplier pour commencer à croître.*

Il semble, en outre, que la période du développement des proplastides au cours de laquelle la Sm est capable d'intervenir est bien délimitée. Les stades finaux de la différenciation paraissent aussi insensibles que les stades initiaux. En effet, la Sm ne peut ni inhiber le verdissement des leucoplastes déjà présents dans des feuilles étiolées ni décolorer secondairement les feuilles vertes. Elle n'atteint donc ni les leucoplastes ni les chloroplastes.

Cette hypothèse permettrait également d'interpréter dans le détail tout le comportement des plantules soumises à l'action de la Sm.

Dans les conditions expérimentales adoptées pour l'expérience de base (solution à 0,2 g de Sm pour 100 ml), il faut tout d'abord que s'écoule un certain temps pour que l'activité de la Sm se manifeste. En effet, la pointe de la première feuille est verte. Dans des solutions plus concentrées en Sm (à partir de 1 %), ce délai n'existe pas : les plantules sont entièrement blanches, ce qui montre qu'aucun chloroplaste n'était formé avant l'application de la Sm mais semble indiquer que, la pénétration de la Sm étant progressive, des chloroplastes ont pu se développer avant que la concentration intracellulaire de l'inhibiteur n'atteigne le seuil minimal d'activité pour les faibles concentrations.

La progression de la zone verte de la première feuille vers la base de celle-ci peut s'expliquer de la même manière : dans la région intermédiaire entre les zones verte et blanche, la concentration en Sm atteinte au moment de la formation des plastes était insuffisante pour bloquer complètement la croissance des proplastides, mais suffisante pour la ralentir d'autant plus considérablement que l'on s'éloigne de la pointe vers la base de la feuille.

Dès que la Sm a atteint, à l'intérieur des cellules en croissance, la concentration seuil à laquelle elle est capable de bloquer complètement le développement des plastes, les nouvelles cellules issues de la région méristématique naissent parfaitement blanches et le demeurent irréversiblement, ce qui pourrait s'expliquer, soit par le fait que la Sm resterait fixée sur les proplastides emportés par ces cellules, soit parce que les cellules entièrement différenciées et ayant achevé leur croissance au cours de la période d'activité de la Sm ne sont plus capables de développer de nouveaux organites, même si l'inhibition qui pesait sur ceux-ci est levée.

Enfin, lorsque, les plantes étant soustraites à l'action de la Sm, la concentration intracellulaire de l'antibiotique a baissé suffisamment, la formation des plastes reprend son cours normal dans les cellules qui sont en voie de différenciation à ce moment. L'action inhibitrice exercée par la Sm sur les cellules embryonnaires est entièrement *réversible*.

L'interprétation développée ci-dessus rejoint une hypothèse que SCHAEFFER<sup>24</sup> a été amené à formuler, par une tout autre voie, au cours d'un travail sur des mutants bactériens streptomycino-exigeants. Cet auteur arrive à l'idée que la Sm bloquerait le développement de particules sensibles à son action, c'est-à-dire exercerait une *action "granulostatique"*.

Toutefois, notre interprétation précise que certains stades seulement du développement des chloroplastes sont sensibles à l'action de la Sm, tous les facteurs responsables de leur continuité continuant d'être produits, mais étant temporairement incapables de réaliser leurs potentialités.

Du point de vue de l'action de la Sm, la situation n'est qu'apparemment différente dans le cas des cellules végétales inférieures chez lesquelles on a pu obtenir des lignées définitivement incolores par l'action de l'antibiotique (Euglènes<sup>2</sup>, algues<sup>25</sup>). Chez ces organismes unicellulaires, comme chez toutes les plantes inférieures, le mode de formation-même des chloroplastes est différent : les chloroplastes ne s'édifient pas progressivement, mais ils se reproduisent par division directe. Les chloroplastes doivent nécessairement croître pour se multiplier. On ne leur connaît pas de précurseurs capables de se multiplier indépendamment de la croissance du plaste différencié.

Cet état de choses entraîne la conséquence grave pour ces organismes que les chloroplastes deviennent pour eux des organites qui peuvent être perdus avec une extrême facilité : il suffit pour cela qu'intervienne un déséquilibre quelconque permettant aux cellules de se multiplier à un rythme plus rapide que celui de la division des chloroplastes. La Sm n'est pas le seul agent capable de mener à ce résultat ; on en connaît deux autres : la culture à l'obscurité (LWOFF ET DUSI<sup>26</sup>) et le choc thermique (PRINGSHEIM, cité par PROVASOLI *et al.*<sup>4</sup>).

Ainsi, l'irréversibilité de l'action de la Sm chez les Euglènes ne semble pas liée au mode d'action de la Sm elle-même, mais aux caractères de la reproduction des chloroplastes chez ces organismes.

Il semble que les données d'ordre biochimique acquises jusqu'à présent soient en accord avec l'hypothèse d'une action granulostatique de la Sm, à laquelle avait abouti la première partie de ce travail. En effet, les résultats obtenus montrent que, si la Sm exerce une action généralisée sur la croissance des plantules d'orge (réduction de la taille et abaissement du rendement global, d'autant plus marqués que la dose de Sm appliquée est plus forte), il se superpose à cette action générale une action dirigée très spécifiquement contre les chloroplastes.

Trois substances caractéristiques des chloroplastes disparaissent complètement sous l'action de la Sm ; ce sont la chlorophylle, les caroténoïdes (SCHOPFER, BEIN ET BESSON<sup>27</sup>) et la polyphénoloxydase. De plus, les cellules s'appauvrisent en protéines et en ARN, dont la nature est chloroplastique selon toute vraisemblance. Car l'observation microscopique ne permet plus de déceler la présence de plastides, même sous la forme des leucoplastes caractéristiques des feuilles étiolées.

Il est possible que l'on puisse y ajouter une quatrième substance : la catalase. Rappelons que la localisation de cet enzyme dans les chloroplastes est incertaine, du fait

qu'on le retrouve associé à des fractions cellulaires différentes suivant le pH auquel se pratique l'isolement des plastes. La catalase est-elle précipitée à pH 5 ou extraite des chloroplastes à pH 7 ? En attendant qu'une réponse d'ordre expérimental soit donnée à cette question, la deuxième éventualité paraît plus probable. En tous cas, il semble que la catalase suive d'une façon très étroite les vicissitudes des chloroplastes (VON EULER<sup>1</sup>), son activité étant réduite de  $\frac{1}{2}$  à  $\frac{4}{5}$  dans les feuilles blanches du mutant albina de l'orge, par rapport à l'activité des feuilles vertes (GYLLING ET VON EULER<sup>28</sup>). De même, dans nos expériences, l'activité de la catalase tombe à 68 % de l'activité normale chez les plantules étiolées qui, on le sait, contiennent moins de plastides que les feuilles vertes. Les résultats obtenus pour les plantules blanches traitées par la Sm ne font que confirmer ceux recueillis précédemment par VON EULER<sup>1</sup>. Ils montrent également que la disparition des chloroplastes est accompagnée d'une chute de la teneur des plantules en catalase qui peut atteindre 90 %. Ainsi, si la catalase n'est pas effectivement localisée dans les chloroplastes, il est cependant fort vraisemblable que ces derniers la synthétisent ou fournissent un élément indispensable à sa synthèse.

Par contre, l'activité respiratoire s'accroît de 75 %, par unité de poids sec de tissu, et même davantage (voir Tableau VI). Il en est de même de la teneur en amidon, qui peut s'accroître d'une manière importante (voir Tableaux III et IV). Ces faits indiquent que les systèmes enzymatiques correspondants ne sont pas, ou sont moins touchés que les chloroplastes, par l'action de la Sm.

Quant aux acides aminés libres, ils s'accumulent jusqu'à atteindre 5 fois la teneur intracellulaire normale, ce qui indiquerait que la synthèse de certaines protéines est bloquée, alors que celle des acides aminés ne l'est pas.

Si l'on reprend les différentes hypothèses qui ont été émises au sujet du mode d'action de la Sm (revue dans HUTNER ET PROVASOLI<sup>29</sup>), il semble que, dans le cas des plantules d'orge, deux d'entre elles puissent être écartées.

1. *Inhibition de la synthèse des chlorophylles.* L'hypothèse suivant laquelle la Sm agirait en inhibant la synthèse des chlorophylles (LWOFF ET SCHAEFFER<sup>30</sup>), semble pouvoir être définitivement écartée par le fait que la Sm n'empêche pas, chez les feuilles étiolées, un verdissement quasi normal, qui implique non seulement la transformation en chlorophylle de la petite quantité de protochlorophylle que ces feuilles renferment, mais aussi la synthèse de nouvelles quantités de protochlorophylle elle-même.

De plus, la comparaison de plantules étiolées et de plantules traitées par la Sm montre clairement que l'action de la Sm dépasse largement les conséquences de l'absence de chlorophylle et de photosynthèse qui ne peuvent donc suffire à l'expliquer.

2. *Inhibition de la respiration.* La dernière partie de ce travail semble montrer que l'activité respiratoire des feuilles d'orge n'est pas modifiée par l'addition de Sm au milieu réactionnel, qu'il s'agisse de la respiration résiduelle ou de celle du glucose, du pyruvate ou du succinate. Ainsi, à moins que la Sm n'agisse en découpant les oxydations des phosphorylations, il apparaît comme peu probable qu'elle intervienne en interrompant la fourniture d'énergie aux cellules.

De plus, il est difficile d'imaginer qu'une action aussi fondamentale puisse entraîner des conséquences touchant le mécanisme du développement des chloroplastes avec une telle spécificité.

3. Par contre, *l'hypothèse d'une action s'exerçant sur l'ARN* (BRACCO ET VON EULER<sup>3</sup>) nous semble beaucoup plus vraisemblable, à la lumière des données nouvelles.

On sait que tous les chloroplastes contiennent de l'ARN; ceux de l'orge, en parti-

culier, renferment 7% d'ARN par rapport aux protéines. On peut penser que les précurseurs des plastes, doués de continuité génétique, possèdent également de l'acide nucléique, comme toutes les particules autoreproductibles étudiées. D'autre part, les arguments se multiplient en faveur de l'idée que l'ARN pourrait jouer un rôle dans la synthèse des protéines (résumé dans DE DEKEN-GRENSON<sup>31</sup>). Parmi les plus frappants et les derniers en date, citons les résultats de GALE<sup>32</sup> et de BRACHET<sup>33</sup> qui ont montré que la ribonucléase inhibe la formation d'enzymes adaptatifs et l'incorporation d'acides aminés dans les protéines. Il est probable que l'ARN agisse en tant que modèle au cours de la synthèse des protéines<sup>31</sup> et des arguments importants ont été apportés récemment par JEENER<sup>34, 35, 36</sup> en faveur de l'hypothèse que l'ARN pourrait jouer un rôle génétique analogue à celui de l'acide désoxyribonucléique. L'ARN des proplastides pourrait jouer un rôle déterminant au cours de la différenciation de ceux-ci en chloroplastes.

Nos résultats expérimentaux sont en accord avec l'hypothèse d'une action de la Sm par la voie de l'ARN: la synthèse des protéines semble bloquée au stade de l'assemblage des acides aminés, qui s'accumulent abondamment, tandis que la synthèse de l'ARN est arrêtée dans les mêmes proportions que la synthèse des protéines (Tableau III) ou un peu plus fortement (Tableau IV) suivant les conditions expérimentales.

Ainsi, l'hypothèse de travail que nous retenons provisoirement est la suivante: eu égard à la propriété qu'a la Sm de former des complexes insolubles avec les acides nucléiques (COHEN<sup>37</sup>), il se peut que la Sm inactive, en se combinant avec lui, l'ARN des proplastides, empêchant ainsi leur croissance et leur différenciation en chloroplastes. Notons que SMOLENS ET VOGL<sup>38</sup> ont montré récemment que la richesse en ARN d'une série de souches de bactéries (caractéristique génétique ou enrichissement dû à un milieu de culture favorable) augmente parallèlement à son pouvoir de résister à la Sm et à la terramycine. Cette relation pourrait s'expliquer, dans le cas qui nous occupe, par le fait que la cellule, disposant de modèles ribonucléoprotéiques en surabondance, n'est pas affectée par l'inactivation d'une faible partie d'entre eux par la Sm.

D'autre part, il est certain que la surprenante spécificité de l'action de la Sm sur le développement des chloroplastes, elle aussi, pourrait s'expliquer plus aisément si la Sm agit en inactivant l'ARN plutôt que par un arrêt de la fourniture d'énergie.

#### RÉSUMÉ

Une étude de l'action de la streptomycine (Sm) sur la formation des chloroplastes chez *Hordeum vulgare*: 1. a confirmé l'idée que la Sm n'inhibe pas seulement la synthèse des chlorophylles, mais celle des chloroplastes eux-mêmes; 2. indique que l'action de la Sm s'exerce d'une manière spécifique sur le développement des chloroplastes, atteignant divers constituants chloroplastiques, tout en respectant d'autres systèmes (le système respiratoire, par exemple).

Des plantules d'orge (*Hordeum vulgare*) qui, par suite de l'action de la Sm, ont formé des feuilles dépourvues de chloroplastes, sont encore capables de produire des feuilles vertes normales lorsque l'action de la Sm est supprimée.

La Sm n'altère donc le patrimoine héréditaire de la plante supérieure étudiée, ni en provoquant la mutation de gènes nucléaires, ni en éliminant des unités cytoplasmiques douées de continuité génétique. Elle inhibe la croissance et la différenciation des proplastides en chloroplastes sans empêcher leur multiplication.

#### SUMMARY

A study of the action of Sm on the formation of chloroplasts by *Hordeum vulgare*: 1. confirmed the idea that Sm inhibits not only the synthesis of the chlorophylls, but also that of the chloroplasts themselves; 2. shows that Sm has a specific action on the development of the chloroplasts, attaining several chloroplastic constituents, whereas others are not touched (respiratory system for example).

Barley seedlings which had formed white leaves as a consequence of the action of Sm are still able to produce normal green leaves when Sm is removed.

Hence, Sm does not alter the hereditary properties of the higher plant studied, by provoking the mutation of nuclear genes nor by eliminating cytoplasmic units possessing genetic continuity. Sm inhibits the growth and the differentiation of proplastids into chloroplasts without preventing their multiplication.

### ZUSAMMENFASSUNG

Eine Untersuchung der Wirkung des Streptomycins (Sm) auf die Bildung von Chloroplasten in *Hordeum vulgare* hat: 1. den Gedanken bestätigt, dass Sm nicht nur die Synthese der Chlorophylle, sondern auch die der Chloroplasten selber hemmt; 2. gezeigt, dass die Wirkung des Sm's sich spezifisch auf die Entwicklung der Chloroplasten erstreckt, indem sie gewisse chloroplastische Bestandteile beeinträchtigt, während andere unberührt bleiben (z.B. das Atmungssystem).

Gerstenkeimlinge die in Folge der Wirkung des Sm's chloroplasten-freie Blätter gebildet haben, sind noch fähig normale grüne Blätter zu bilden, wenn die Wirkung des Sm's ausgeschaltet wird.

Das Sm ändert also die erblichen Eigenschaften der untersuchten höheren Pflanze, weder durch Hervorrufen von Mutationen der Kerngene, noch durch Eliminierung von cytoplasmatischen Einheiten, die genetische Kontinuität besitzen. Das Sm hemmt das Wachstum und die Differenzierung der Proplastiden in Chloroplasten ohne ihre Vermehrung zu verhindern.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> H. VON EULER, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, 25 A (1947) 17.
- <sup>2</sup> L. PROVASOLI, S. H. HUTNER ET A. SCHATZ, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 69 (1948) 279.
- <sup>3</sup> M. BRACCO ET H. VON EULER, *Kem. Arb.*, 2 (1947) 10.
- <sup>4</sup> L. PROVASOLI, S. H. HUTNER ET I. J. PINTER, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 16 (1951) 117.
- <sup>5</sup> M. DE DEKEN-GRENSON, *Arch. Intern. Physiol.*, 62 (1954) 290.
- <sup>6</sup> H. B. VICKERY, G. W. PUCHER, A. J. WAKEMAN ET C. S. LEAVENWORTH, *Bull. Conn. Agr. Expt. Sta.*, 399 (1937).
- <sup>7</sup> W. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 293.
- <sup>8</sup> R. VENDRELY, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 95.
- <sup>9</sup> M. OGUR ET G. ROSEN, *Arch. Biochem.*, 25 (1950) 262.
- <sup>10</sup> S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- <sup>11</sup> J. BONNER ET A. MILLERD, *Arch. Biochem.*, 42 (1953) 135.
- <sup>12</sup> R. CHAMBERS, *Biol. Symposia*, 10 (1943) 91.
- <sup>13</sup> W. C. SCHNEIDER ET V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 149 (1943) 217.
- <sup>14</sup> F. PATTI ET P. BONET-MAURY, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 1177.
- <sup>15</sup> S. GRANICK, dans *Photosynthesis in Plants*, éd. Loomis (1949) 125.
- <sup>16</sup> L. LI ET J. BONNER, *Biochem. J.*, 41 (1947) 105.
- <sup>17</sup> D. ARNON, *Nature*, 162 (1948) 341.
- <sup>18</sup> G. LATIES, *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 404.
- <sup>19</sup> C. E. HAGEN ET V. V. JONES, *Botan. Gaz.*, 114 (1952) 130.
- <sup>20</sup> W. W. UMBREIT, The Mode of Action of Streptomycin dans le *Symposium sur le mode d'action des antibiotiques*, IIe Congrès International de Biochimie, Paris 1952, p. 63.
- <sup>21</sup> L. F. RANDOLPH, *Botan. Gaz.*, 73 (1922) 337.
- <sup>22</sup> S. STRUGGER, *Naturwiss.*, 37 (1950) 166.
- <sup>23</sup> P. MICHAELIS, Cytoplasmic Inheritance in *Epilobium*, *Adv. Genetics*, 6 (1954) 295.
- <sup>24</sup> P. SCHAEFFER, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 563.
- <sup>25</sup> J. F. DUBÉ, *Science*, 116 (1952) 278.
- <sup>26</sup> A. LWOFF ET H. DUSI, *Compt. rend. soc. biol.*, 119 (1935) 1092.
- <sup>27</sup> W. H. SCHOPFER, M. BEIN ET G. BESSON, *Actes soc. helv. sci. nat.*, (1951) 148.
- <sup>28</sup> E. I. GYLING ET H. VON EULER, *Bull. soc. chim. biol.*, 34 (1952) 86.
- <sup>29</sup> S. H. HUTNER ET L. PROVASOLI, The Phytoflagellates dans *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, éd. A. LWOFF, Acad. Press, N.Y. (1951) 82.
- <sup>30</sup> A. LWOFF ET P. SCHAEFFER, *Compt. rend.*, 228 (1949) 511.
- <sup>31</sup> M. DE DEKEN-GRENSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 560.
- <sup>32</sup> E. F. GALE ET J. B. FOLKES, *Nature*, 173 (1954) 1223.
- <sup>33</sup> J. BRACHET, *Nature*, 174 (1954) 876.
- <sup>34</sup> R. JEENER, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 438.
- <sup>35</sup> R. JEENER, *ibid.*, 13 (1954) 148.
- <sup>36</sup> R. JEENER, *ibid.*, 14 (1954) 321.
- <sup>37</sup> S. S. COHEN, *J. Biol. Chem.*, 166 (1946) 393.
- <sup>38</sup> J. SMOLENS ET A. B. VOGT, *J. Bact.*, 66 (1953) 140.

Reçu le 27 novembre 1954