

RECHERCHES SUR LES INTERACTIONS BIOCHIMIQUES
ENTRE LE NOYAU ET LE CYTOPLASME CHEZ LES ORGANISMES
UNICELLULAIRES

I. *AMOEBA PROTEUS*

par

J. BRACHET

*Laboratoire de Morphologie animale, Faculté des Sciences de l'Université
libre de Bruxelles (Belgique)*

INTRODUCTION

Les recherches qui ont été effectuées, à la suite des travaux initiaux de CLAUDE¹ et de BRACHET ET JEENER², par les très nombreux chercheurs (CHANTRENNE³, HOGEBOOM ET SCHNEIDER⁴, MIRSKY *et al.*⁵, DOUNCE⁶, DE DUVE ET BERTHET⁷, *etc.*) qui ont étudié la composition chimique des constituants cellulaires isolables par la centrifugation fractionnée d'homogénats, ont une très grande importance en biochimie cellulaire. Ces recherches souffrent cependant, comme le montrent notamment la revue récente de DOUNCE⁶ sur la composition enzymatique du noyau et celle de DE DUVE ET BERTHET⁷ sur les enzymes des granules cytoplasmiques (mitochondries et microsomes), de certaines objections: signalons notamment le risque d'une adsorption de certains enzymes solubles sur les constituants cellulaires au cours de leur isolement ou, au contraire, le danger d'une perte d'enzymes à ce même moment. En outre, la technique, si fructueuse à tant de points de vue, de l'analyse biochimique des constituants cellulaires isolés par centrifugation différentielle ne peut guère donner de renseignements sur un point fondamental de la biochimie cellulaire: la nature des interactions qui se produisent, dans la cellule *vivante*, entre ses divers constituants.

Une analyse de ces interactions est cependant possible en ce qui concerne le rôle biochimique du *noyau* cellulaire: il suffit, pour atteindre ce but, de s'adresser à des organismes unicellulaires, de les couper en deux fragments et de comparer, au point de vue biochimique, le sort des moitiés nucléée et anucléée. C'est ce que nous avons entrepris de faire chez un Protozoaire, *Amoeba proteus*, et chez une algue unicellulaire, *Acetabularia mediterranea*. Le présent travail, qui est consacré presque uniquement à l'amibe, a pour but de rassembler les données que nous avons recueillies depuis 5 ans, et qui n'ont fait encore l'objet que de communications préliminaires. Ces données seront confrontées avec les résultats extrêmement intéressants qui ont été obtenus entretemps dans un autre laboratoire animé des mêmes préoccupations, celui de MAZIA.

Nous ne pouvons songer à exposer ici toutes les hypothèses qui ont été émises au sujet du rôle "général" (par opposition au rôle "génétique") que le noyau pourrait jouer

Bibliographie p. 267/268.

dans le métabolisme cellulaire: nous renverrons donc aux revues d'ensemble (MAZIA⁸, BRACHET^{9,10}) qui ont été consacrées récemment à la question. Disons seulement que parmi toutes les hypothèses qui ont été avancées, 5 seulement méritent de retenir l'attention: (1) Le noyau serait le centre des oxydations cellulaires (LOEB¹¹). (2) Le noyau constituerait un lieu de synthèse ou d'accumulation des enzymes (WILSON¹²). (3) La synthèse des co-enzymes nucléotidiques se ferait dans le noyau (BRACHET¹³, MIRSKY *et al.*¹⁴, HOGEBOOM ET SCHNEIDER¹⁵). (4) Le noyau serait le siège principal de la synthèse des protéines (CASPERSSON¹⁶). (5) Le noyau servirait à assurer le remplacement des constituants chimiques utilisés par le cytoplasme (MAZIA⁸). Ces hypothèses, ainsi que les nombreux travaux qui ont été effectués sur la composition chimique et enzymatique des noyaux isolés (*cf.* DOUNCE⁶), nous serviront de fil conducteur pour la suite de ce travail.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Les amibes (*Amoeba proteus*) que nous avons utilisées ont été mises aimablement à notre disposition par le Dr. H. HOLTER et le Prof. J. DANIELLI, à qui vont nos plus vifs remerciements. Elles ont été cultivées selon la technique de CHALKLEY¹⁷, en présence de grains de riz et d'une population hétérogène de Ciliés, de Rotifères, de Flagellés et de Bactéries. Les conditions de la culture diffèrent donc de celles, plus rationnelles d'ailleurs, qui ont été mises récemment au point dans le laboratoire de MAZIA (JAMES¹⁸, PRESCOTT ET MAZIA¹⁹).

Les amibes étaient mises à jeûn pendant 2 jours dans du liquide de Chalkley avant d'être coupées en deux au moyen d'un cheveu de verre. Comme les fragments anucléés se roulent rapidement en boules et qu'ils sont incapables de se nourrir, les amibes opérées étaient conservées à jeûn dans du Chalkley fréquemment renouvelé.

Pour les examens *cytochimiques*, les fragments étaient généralement fixés au mélange alcool-formol-acétique de Serra et soumis à un double enrobage dans l'agar et la paraffine. La détection de l'acide ribonucléique (ARN) a été effectuée par la technique que nous avons décrite²⁰, celle de l'acide désoxyribonucléique (ADN) par la réaction de Feulgen; les méthodes de HORCHKISS et de BAUER ont été utilisées pour la détection du glycogène, la coloration au Soudan selon Jackson (après fixation au formol) pour celle des glycérides; la réaction de Millon et celle de l'arginine, d'après Serra, ont été utilisées pour les protéines; les peroxydases, l'indophénoloxydase et la réduction du chlorure de triphényltetrazolium (TPTC) ont été étudiés par les techniques classiques. Toutes les méthodes cytochimiques employées sont décrites dans l'ouvrage de GLICK²¹.

Les *dosages quantitatifs* ont été effectués par les méthodes mises au point par HOLTER ET LINDESTRÖM-LANG (*cf.* GLICK²¹). Les mesures de la *consommation d'oxygène* ont été effectuées au moyen des ludions de LINDESTRÖM-LANG ET HOLTER; on s'est servi, pour les dosages colorimétriques, soit d'un microcolorimètre de KRUGELIS²², soit des microcellules d'un Beckman. Afin de simplifier les mesures, la teneur en protéines a été déterminée, selon les conseils du Dr. HOLTER, en dosant la tyrosine présente dans les amibes par la réaction de Folin. Le microdosage de l'ADN a été fait, au Beckman, par une microadaptation de la technique d'OGUR ET ROSEN²³ et celui du glycogène par la microméthode de BOETTIGER²⁴ à la diphenylamine.

Les dosages du *phosphore* (^{32}P labile en 7', ^{32}P libéré par la myosine pour la mesure de l'ATP, détection de l'ATPase, des phosphatases acide et alcaline, de la phosphorylase et de l'hexokinase) ont été effectués selon les indications de KRUGELIS²². La protéase, la dipeptidase, l'estérase et l'amylase ont été dosés selon HOLTER ET LOVTRUP²⁵ et selon LINDESTRÖM-LANG ET HOLTER (*cf.* GLICK²¹). L'énolase a été estimée par une microadaptation de la technique de LOHMANN ET MEYERHOF²⁶; quant aux enzymes intervenant dans le métabolisme des nucléotides (nucléosidephosphorylase, guanase, adénosinedésaminase), ils ont été suivis spectrophotométriquement au Beckman en réduisant fortement les volumes employés dans les méthodes mises au point par KALCKAR²⁷.

Comme nous donnerons, à propos de chaque dosage, des indications plus précises sur les conditions expérimentales (nombre d'amibes ou de fragments utilisés, volumes employés, temps d'incubation, température, *etc.*), nous nous bornerons à ajouter ici que les mesures de la pénétration du ^{32}P ont été faites au moyen d'un compteur Tracerlab et que, pour le dosage de l'ATP, la méthode de STREHLER ET TOTTER²⁸, basée sur la production de lumière en ajoutant de l'ATP à un extrait de *Photinus pyralis*, s'est avérée commode et fidèle.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. *Observations cytochimiques*

L'utilité des observations cytochimiques réside surtout dans le fait qu'elles sont les seules à démontrer la très grande hétérogénéité du matériel: chaque fragment évolue, en effet, pour son propre compte au cours du temps. Cette remarque générale faite, passons rapidement en revue les principaux résultats obtenus.

L'*acide désoxyribonucléique*, qui est localisé strictement dans la partie centrale du noyau (l'endosome), ne nous retiendra guère: absent dans les fragments anucléés, il ne semble pas subir de variations quantitatives importantes dans les moitiés nucléées, même quand elles sont soumises à un jeûne prolongé. Cette constatation cadre d'ailleurs fort bien avec tout ce qu'on sait au sujet de la grande stabilité de ce constituant du noyau. Ajoutons cependant que les noyaux des organismes qui ont été ingérés par les amibes donnent aussi une vive réaction de Feulgen; cette réaction devient entièrement négative en 1-2 jours, dans les deux types de fragments; il faut en conclure que le cytoplasme de l'amibe doit contenir de la désoxyribonucléase et que cet enzyme demeure actif, en l'absence du noyau, pendant 1 ou 2 jours au moins.

Passons à l'ARN qui, dans l'amibe intacte, se trouve en particulière abondance dans les nucléoles: on n'observe, en général pas de différences nettes entre les deux types de fragments peu après la section. Mais, deux ou trois jours après l'énucléation certains fragments anucléés se colorent moins fortement à l'Unna que les autres. Petit à petit, cette perte de la basophilie atteint tous les fragments anucléés et, dès le cinquième jour après l'opération, la différence entre les moitiés nucléées et les anucléées devient très nette. Le contraste entre les deux types de fragments s'accuse encore, une semaine après l'énucléation, et elle se maintient jusqu'à la fin de l'expérience (12-14 jours après la section). Les photographies 1 et 2 en apportent une démonstration, en montrant la diminution de la colorabilité à l'Unna. L'énucléation conduit donc à une

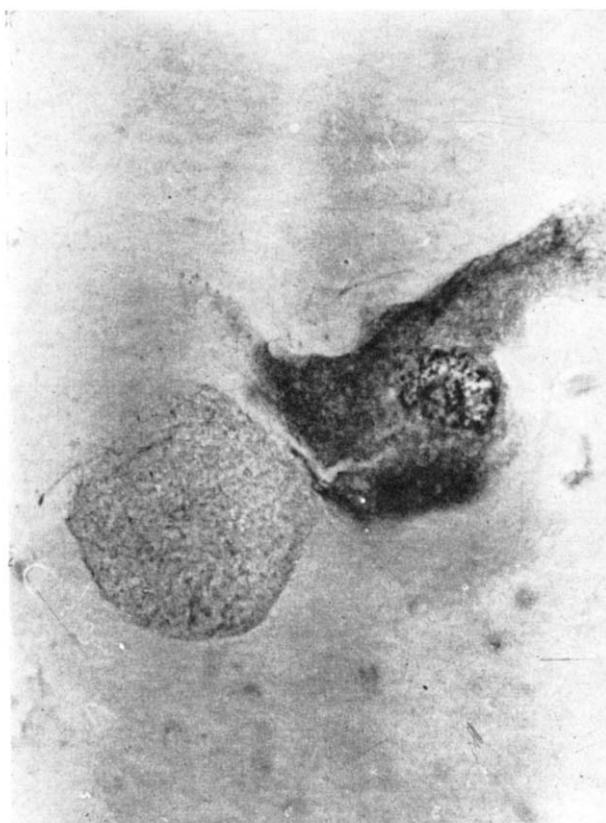


Fig. 1. Acide ribonucléique. Fragment nucléé à droite et fragment anucléé à gauche (Unna) une semaine après l'opération.



Fig. 2. Acide ribonucléique. Même technique. Fragment nucléé en haut et anucléé en bas.

les amibes, prises individuellement, ont des teneurs à réserve; en ce qui concerne le glycogène, qui a été étudié de près par diverses méthodes cytochimiques (réactions au lugol, de Bauer et de Hotchkiss, contrôle à l'amylase salivaire), l'examen ne montre pas de différences nettes entre les fragments provenant d'amibes coupées depuis 1-2 jours; mais, au 4^e jour, les fragments qui restent riches en glycogène sont, en grande majorité, dépourvus de noyau. Cet état de choses devient encore plus apparent par la suite: au 9^e jour, la plupart des fragments nucléés sont très pauvres en glycogène, tandis que les moitiés anucléées donnent toutes une réaction intense. La coloration des graisses au Soudan fournit des indications identiques, mais les examens ont été moins poussés dans ce cas. On peut donc conclure que *l'attaque du glycogène et, probablement, celle des graisses sont sensiblement diminuées au bout de quelques jours, dans le cytoplasme anucléé* (Fig. 3 et 4).

Passons aux phénolases (indophénoloxydase, peroxydase) et à la réduction du TPTC (qui est d'ailleurs lente et faible): les méthodes utilisées n'ont pas montré de différences sensibles entre les deux types de fragments, même après 12 jours. Tout au plus observe-t-on, dans le cas de la peroxydase, la présence en plus grand nombre de boules volumineuses, colorées en bleu, dans les fragments nucléés que dans les autres.

Bibliographie p. 267/268.

diminution marquée de la teneur en ARN du cytoplasme; elle correspond sans doute à une décroissance du nombre des microsomes ou à une altération de ces particules. Au contraire, la teneur en ARN des fragments nucléés ne paraît pas s'abaisser sensiblement à la suite d'un jeûne prolongé.

En ce qui concerne les *protéines*, la réaction de Millon est donnée de façon sensiblement homogène par toute l'amibe; au contraire, celle de Serra (arginine) indique une teneur plus élevée en cet acide aminé dans le noyau (nucléoles et endosome) que dans le cytoplasme; mais, dans l'un et l'autre cas, la simple inspection visuelle des coupes au microscope — sans analyse histophotométrique — ne permet pas de déceler de modifications notables dans la teneur en protéines, à la suite de l'ablation du noyau.

L'évolution du *glycogène* et celle des *graisses* sont plus difficiles à suivre, parce que

très inégales en substances de

Ces boules s'observent aussi après coloration vitale au rouge neutre, au bleu de toluidine ou au bleu de crésyle brillant; il ne s'agit, semble-t-il, que de vacuoles où s'accumulent les colorants qui subissent un virage métachromatique. C'est sans doute à cause de l'existence de ces vacuoles que les fragments anucléés présentent toujours un aspect plus homogène du cytoplasme que les noyaux des moitiés nucléées, après coloration à l'Unna ou au Serra.

Les examens cytochimiques conduisent donc aux principales conclusions suivantes: l'ablation du noyau cause une diminution de la teneur en acide ribonucléique du cytoplasme et une restriction dans l'utilisation des réserves glucidiques et lipidiques. Les protéines et les enzymes respiratoires ne paraissent, par contre, guère affectés. Voyons maintenant si ces con-



Fig. 3. Glycogène. Fragment nucléé à droite et fragment anucléé à gauche (Hotchkiss)
Une semaine après l'opération.



clusions se voient confirmées par les mesures quantitatives.

2. Mesures quantitatives

a. *Volume des fragments.* Le volume a été mesuré en faisant passer les amibes ou les fragments d'amibes dans un capillaire (60μ de diamètre) et en déterminant leur longueur. Dans le tableau ci-dessous et les suivants, N = fragments nucléés, A = fragments anucléés. Les valeurs données sont des moyennes et le nombre des mesures est indiqué (au Tableau I) entre parenthèses.

On voit (Fig. 5) que l'opération a pour conséquence une augmentation momentanée du

Fig. 4. Glycerides. Fragment nucléé à droite et fragment anucléé à gauche (Soudan) Une semaine après l'opération.

TABLEAU I
VOLUME EN $10^{-3} \mu\text{l}$

Jours après l'énucleation	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Amibes entières	2.32 (60)										
2. N	1.13 (9)	1.34 (83)	1.42 (107)		1.33 (58)		1.27 (62)		1.25 (32)		1.25 (25)
3. A	0.96 (17)	0.79 (80)	0.73 (107)		0.78 (44)		0.71 (42)		0.66 (50)		0.68 (34)
4. N/A	1.21	1.63	1.93		1.67		1.81		1.89		1.83

volume des fragments nucléés; dans le cas des fragments anucléés, on assiste, au contraire, à une diminution d'abord rapide, puis plus lente du volume. Cette différence de comportement entre les deux types de fragments est sans doute la conséquence de variations dans le degré d'*hydratation* des fragments; une telle explication rend compte de l'aspect plus homogène des fragments anucléés sur coupes.

Passons maintenant aux dosages de la tyrosine, qui nous servira d'indice pour la teneur en protéines.

b. *Teneur en protéines* (tyrosine). Technique. 50 à 200 amibes sont traitées par 8 μl NaOH N/10 et 37 μl de "Soda" (4 g Na_2CO_3 + 10 mg CuSO_4 + 40 mg tartrate de Na dans 100 ml H_2O . Ajouter 0.3 ml HCl N à 5 ml de cette solution). On ajoute 8 μl de réactif de Folin. Après 20 minutes, lecture au microcolorimètre de KRUGELIS²².

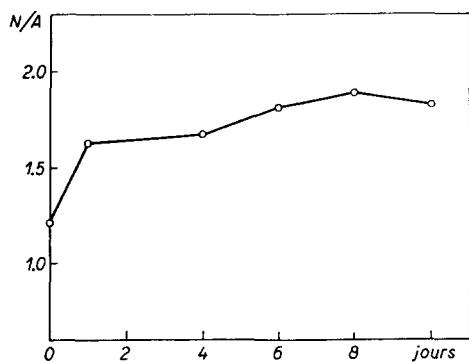


Fig. 5. Volume (rapport N/A en fonction du temps).

TABLEAU II

TENEUR EN TYROSINE EN $\gamma/100$ FRAGMENTS

Jours après l'opération	1	3	5	7	9	11
N	0.27	0.29	0.26	0.27	0.23	0.23
A	0.23	0.22	0.14	0.15	0.12	0.125
N/A	1.12	1.32	1.85	1.77	1.90	1.87

Les résultats des dosages, faits en double au cours de 2 expériences indépendantes, sont consignés au Tableau II et sur le Fig. 6.

Il est à remarquer que le rapport N/A initial (1.12) est voisin de celui qu'on trouve pour le volume immédiatement après l'opération: il faut s'attendre à trouver un rapport N/A de l'ordre de 1.1-1.2, chaque fois que la substance à doser n'est pas accumulée dans le noyau. Notons aussi que les fragments nucléés ne perdent guère de protéines à la suite du jeûne (15% seulement); l'utilisation des protéines est d'ailleurs tardive dans ces fragments, puisqu'elle ne débute qu'après une semaine; au contraire, les fragments anucléés ne conservent intactes leurs protéines que pendant 3-4 jours: *entre le 3^e et le 5^e jour, une forte "autophagie" se produit et on voit la teneur en protéines tomber de près de 50% entre le 3^e et le 9^e jour.*

Comparons maintenant aux protéines une substance de réserve typique, le glycogène.

c. *Glycogène*. Technique: 100 fragments sont hydrolysés pendant 30 minutes dans 30 μl de KOH 30 % à 100°; précipitation par 30 μl H_2O + 100 ml d'alcool absolu: 1 min à 100°, 2 h à 3°. Centrifugation de 15 min à 4.000 t/min. Evaporation du culot, qu'on redissout dans 20 ml H_2O . Chauffer 40 min à 100° avec 50 μl de réactif à la diphenylamine²⁴. Lecture au microcolorimètre.

Dans ce cas encore, les valeurs qui sont consignées au Tableau III et sur le Fig. 6 proviennent de 2 expériences indépendantes, effectuées en double.

TABLEAU III
TENEUR EN GLYCOGÈNE EN $\gamma/100$ FRAGMENTS

Jours après l'opération	0	1	3	6	8	10
100 amibes entières a (5 mesures)	4.3	—	—	—	—	—
N		2.20	1.40	1.30	1.20	1.10
A		1.85	1.35	1.45	1.40	1.40
N/A		1.19	0.97	0.89	0.89	0.78

Les chiffres montrent que, conformément aux observations cytochimiques, le glycogène est distribué également dans les deux types de fragments (rapport N/A de 1.13): il se produit, tant dans les moitiés anucléées que dans les autres, une glycogénolyse importante au cours des 3 premiers jours. Mais, à ce moment, l'utilisation du glycogène cesse dans les fragments anucléés. Si on compare ces données à celles qui ont été obtenues dans le cas de la tyrosine (cf. Tableau I), on voit que la *disparition du noyau a pour conséquence de provoquer une utilisation hâtive et excessive des protéines au moment où la glycogénolyse s'arrête*; l'attaque du glycogène cytoplasmique se trouve donc sous le contrôle du noyau: mais ce contrôle n'est pas immédiat et son interruption ne manifeste ses effets qu'après un temps de latence de 3 jours environ.

d. *ARN*. Technique: 200 amibes ou 300 à 400 fragments sont extraits avec 150-200 μl ClO_4H 2 % pendant 20 minutes. Le résidu est extrait 24 h à 3° avec 150-200 μl ClO_4H 10 %. Mesure de l'absorption du surnageant au Beckman (microcuvettes).

Comme le montrent le Tableau IV et la Fig. 6, les dosages confirment l'impression recueillie lors des observations cytochimiques: l'énucléation conduit à une diminution rapide de l'ARN cytoplasmique qui, comme nous nous en sommes assuré

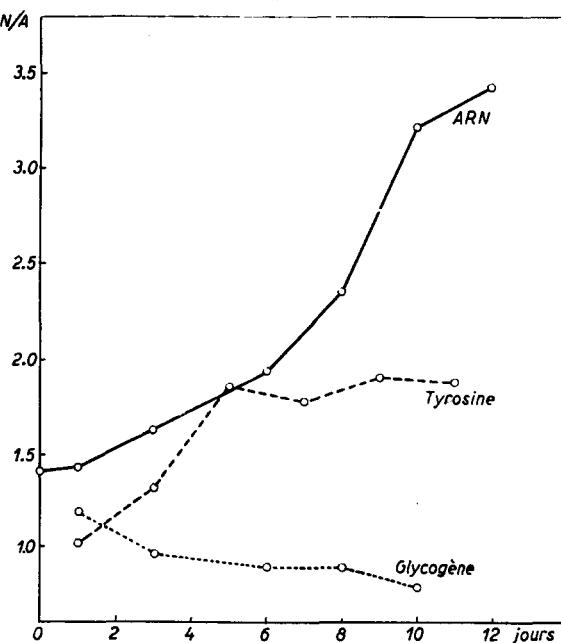


Fig. 6. ARN, tyrosine et glycogène (rapport N/A en fonction du temps).

par des expériences de centrifugation fractionnée sur des homogénats d'amibes, est principalement localisé dans les microsomes.

TABLEAU IV
ARN EN $\gamma/200$ FRAGMENTS (moyennes de 4 expériences)

Jours après l'enucléation	0	1	3	6	8	10	12
N	0.62	0.63	0.58	0.56	0.54	0.61	0.62
A	0.44	0.44	0.36	0.29	0.23	0.19	0.18
N/A	1.41	1.43	1.61	1.93	2.35	3.21	3.42

On notera, avec intérêt, la valeur élevée (1.41 à 1.43) du rapport initial: elle reflète certainement la richesse exceptionnelle en ARN des nucléoles. On voit aussi que si les fragments nucléés parviennent à maintenir leur teneur en ARN à un niveau sensiblement normal au cours du jeûne, une chute progressive et massive (qui atteint près de 60%) de l'ARN se produit dans les moitiés anucléées. Il faut en conclure que *le noyau exerce un contrôle important sur le maintien, dans le cytoplasme, des granules riches en ARN, c'est-à-dire des microsomes.*

Des résultats analogues, qui confirment ceux que nous avions publiés dans une note préliminaire (LINET ET BRACHET²⁹), ont été publiés récemment par JAMES¹⁸; toutefois, selon cet auteur, la teneur en ARN des amibes *entières* soumises au jeûne s'abaisserait presque dans la même proportion que celle des fragments anucléés. Comme cette observation de JAMES¹⁸ se trouve en contradiction avec les très nombreux examens cytochimiques que nous avons effectués sur des amibes entières à jeûn, nous avons repris la question en effectuant 3 séries indépendantes de dosages de l'ARN (en double ou en triple) sur des amibes intactes mises à jeûn. En voici les résultats (Tableau V):

TABLEAU V
ARN EN $\gamma/100$ AMIBES

Jours de jeûne	0	1	3	5	8	11	13
	0.68	0.58	0.53	0.51	0.53	0.53	0.54

Comme on le voit, à part une diminution initiale qui correspond certainement à la digestion des proies ingérées par les amibes (qui avaient été abondamment nourries juste avant de commencer les expériences), nous ne retrouvons pas la chute de l'ARN, au cours du jeûne, qui a été signalée par JAMES¹⁸. Les raisons de ce désaccord tiennent certainement aux conditions différentes de culture adoptées dans les deux laboratoires: en effet, quelques dosages effectués sur des amibes maintenues à jeûn dans des cristallisoirs à fond d'agar ont permis de retrouver les résultats de JAMES¹⁸; dans ce cas, les amibes étaient devenues très petites et on s'explique aisément dès lors qu'elles aient subi une forte perte en acide ribonucléique. Remarquons encore que si on tient compte du fait que les amibes opérées (*cf.* Tableau IV) avaient été soumises à un jeûne de 2 jours avant d'être coupées en deux, les résultats obtenus dans les deux expériences (Tableaux IV et V) concordent parfaitement.

Passons maintenant au métabolisme (oxydations et phosphorylations) des fragments d'amibes.

e. *Consommation d'oxygène.* Les effets de l'énucléation sur la consommation d'oxygène de *A. proteus* ont été étudiés, bien avant nous, par CLARK³⁰: enlevant le noyau au micromanipulateur et mesurant la consommation d'oxygène au moyen d'un micro-respiromètre très sensible, mais probablement sujet à de nombreuses causes d'erreurs, CLARK³⁰ est arrivé à la conclusion que l'énucléation abaisse fortement et rapidement le taux de la respiration: en particulier, les oxydations cellulaires sensibles au cyanure seraient très vite inhibées en l'absence du noyau. Comme il est, à l'heure actuelle, bien établi que le cytochromoxydase est un constituant des mitochondries et non du noyau (*cf.* les revues de DE DUVE ET BERTHET⁷ et de DOUNCE⁶), il était particulièrement important de vérifier l'exactitude des dires de CLARK³⁰.

Technique. Ludions cylindriques de LINDERSTRÖM-LANG ET HOLTER²¹. Volume total de 10 à 15 μ l. Amibes ou fragments d'amibes, au fond du ludion, dans 1.13 μ l de Chalkley. NaOH N 1.13 μ l. Paraffine liquide 1.13 μ l. "Mouth seal" 2.26 μ l. $T^{\circ} 22^{\circ}8 \pm 0.01^{\circ}$. Lectures d'heure en heure pendant 4-5 h. Contrôle sous le microscope à chaque lecture de l'état des amibes.

Une première série d'expériences, effectuées sur des amibes intactes, à montré que la consommation d'oxygène par amibe et par heure est d'environ $0.29 \cdot 10^{-3} \mu\text{l}/\text{heure}$ (moyenne de 15 mesures, où le nombre des amibes par ludion variait de 10 à 30). Ce chiffre est 4 fois inférieur à celui donné par CLARK³⁰ ($1.2 \cdot 10^{-3} \mu\text{l}/\text{amibe/h}$).

Les mesures qui ont été effectuées sur des fragments (60 par ludion en général) ont donné les résultats qui sont consignés au Tableau VI et sur le Fig. 7. Les chiffres du Tableau VI représentent la moyenne de 6 mesures individuelles au moins.

TABLEAU VI
CONSOMMATION D'OXYGÈNE EN $10^{-3} \mu\text{l}/\text{FRAGMENT}/\text{HEURE}$

<i>Jours après l'opération</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>7</i>	<i>10</i>
N	0.188	0.234	0.185	0.186	0.109
A	0.137	0.153	0.138	0.140	0.066
N/A	1.37	1.53	1.35	1.33	1.65
N + A	0.325	0.387	0.323	0.326	0.175

L'inspection de ce tableau et de la Fig. 7 suffisent à montrer que, contrairement à ce que croyait CLARK³⁰, l'ablation du noyau n'exerce aucune influence sensible sur le taux des oxydations cellulaires pendant au moins 1 semaine; il faut en conclure que les mitochondries, dont on sait qu'elles contiennent de la cytochromoxydase chez un myxomycète voisin des amibes (HOLTER ET POLLOCK³¹), sont largement indépendantes du noyau en ce qui concerne leur maintien et leur fonctionnement. On notera cependant que le

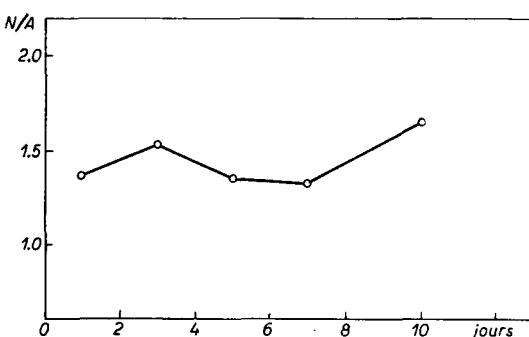


Fig. 7. Consommation d'oxygène (rapport N/A en fonction du temps).

rapport initial N/A (1.37) est plus élevé qu'on n'aurait pu le prévoir si le noyau ne jouait aucun rôle dans les oxydations cellulaires. Remarquons aussi que la respiration des deux moitiés additionnées tend à être supérieure à celle des amibes entières: ce désaccord entre les chiffres obtenus pour les fragments et celui observé dans le cas des amibes intactes ($0.29 \cdot 10^{-3} \mu\text{l}$) est surtout marqué 3 jours après l'opération: à ce moment les oxydations des fragments (surtout celles des fragments nucléés) semblent nettement accrues. Peut-être faut-il rapprocher ce fait de l'augmentation de volume qui se produit à ce moment dans les fragments nucléés (*cf.* plus haut). On remarquera, en outre, que la consommation d'oxygène des deux types de fragments diminue nettement après 10 jours: à ce moment, ce sont les fragments anucléés qui sont les plus atteints et il est probable qu'il se produit alors des altérations dans le fonctionnement de leurs mitochondries. La diminution de la respiration des fragments nucléés, à la suite d'un jeûne prolongé, cadre d'ailleurs avec les observations que HOLTER ET ZEUTHEN³² ont faites sur *Chaos chaos*.

Passons maintenant au métabolisme phosphoré des fragments d'amibes.

f. *Pénétration du phosphate radioactif* (³²P). On doit à MAZIA ET HIRSHFIELD³³ la découverte d'un fait important: c'est que, très rapidement après l'énucléation, la pénétration du phosphate radioactif est considérablement diminuée dans les fragments anucléés. Comme ce changement est le seul connu qui se produit en quelques heures, notre ancienne collaboratrice D. THOMASON a repris et étendu les observations de MAZIA ET HIRSHFIELD³³, en suivant exactement la technique des auteurs américains.

Les expériences, qui souffraient malheureusement une grande variabilité, ont donné les résultats qui sont consignés dans le Tableau VII, où les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre des expériences.

TABLEAU VII

VALEURS MOYENNES DE LA RADIOACTIVITÉ (c. min/amibe ou fragment)

1. Amibes entières traitées 24 h par ³²P: 17.3 (50).
2. Amibes entières traitées 24 h par ³²P, puis coupées en deux:
N: 24.9 (11); A: 17.1 (11); N/A: 1.46.
3. Fragments traités 24 h par ³²P.

Jours après l'énucléation	0 (2-3 h)	3	6	9
N	11.3 (9)	17.4 (4)	77.5 (4)*	12.2 (6)
A	4.8 (7)	2.8 (4)	2.5 (4)	2.2 (4)
N/A	2.35	6.2	31.0	5.5

* Chiffre sans doute trop élevé, à la suite d'une contamination bactérienne ou de lavages insuffisants.

L'inspection de ce tableau et celle de la Fig. 6 confirment entièrement les résultats de MAZIA ET HIRSHFIELD³³: on voit, en effet, que dans les amibes traitées au ³²P, puis coupées en deux, il ne se produit pas d'accumulation massive de l'isotope dans le fragment nucléé: le rapport N/A de 1.46, est du même ordre de grandeur que celui que nous avons déjà trouvé pour l'ARN (1.41). Au contraire, si ce sont des fragments qui sont placés dans le phosphate radioactif, la pénétration du ³²P est fortement inhibée dans la moitié anucléée, déjà quelques heures après l'enlèvement du noyau. Au bout de quelques jours, la différence de comportement entre les deux fragments s'accentue encore fortement, puisque le rapport N/A passe de 2.35 à 5.5-6.

Le mécanisme de la pénétration du ^{32}P à l'intérieur de l'amibe n'est pas connu; mais, par analogie avec d'autres cellules (*cf.* la revue récente de ROTSTEIN³⁴), on peut présumer qu'il s'agit d'un phénomène actif, impliquant des réactions enzymatiques au niveau de la membrane. Celle-ci doit d'ailleurs subir des modifications à la suite de l'enlèvement du noyau, si on en juge par l'arrêt de la locomotion et par les variations de volume qui se produisent peu après. Ce sont ces considérations, jointes aux observations que nous avons faites sur la respiration des fragments d'amibes, qui nous ont amené à nous demander¹³ si l'ablation du noyau ne causerait pas une interruption du couplage normal entre les oxydations et les phosphorylations. Le noyau interviendrait dans ce couplage par la production de co-enzymes et son enlèvement conduirait à une situation comparable à celle que provoque le dinitrophénol (augmentation des oxydations et arrêt de la pénétration du ^{32}P). C'est afin d'éprouver la valeur de cette hypothèse que nous avons abordé l'étude de la teneur en ATP des amibes, tant en aérobiose qu'en anaérobiose.

g. *La teneur en ATP des fragments d'amibes.* Si l'enlèvement du noyau provoquait, comme le dinitrophénol, une interruption du couplage entre les oxydations et les phosphorylations, on devrait s'attendre à observer une chute rapide de la teneur en ATP des fragments anucléés, sans changements appréciables des moitiés nucléées. L'examen du Tableau VIII suffit à montrer que cette prédiction ne se vérifie pas.

Technique: 200 fragments sont cytolysés par le froid et extraits avec un volume connu d'acide trichloracétique à 10%. Centrifugation. 10 μl d'extrait sont additionnés de 10 μl de H_2SO_4 2 N. Chauffage pendant 7 minutes à 100°. Dosages en triple du P inorganique libéré et du P inorganique initial, selon KRUGELIS²².

TABLEAU VIII
ATP EN γ DE P 7' PAR 100 FRAGMENTS (moyennes de 3 expériences indépendantes)

Jours après l'énucléation	1	3	6	9	12
N	0.0107	0.0098	0.0104	0.0115	0.0085
A	0.0093	0.0088	0.0097	0.0085	0.0070
N/A	1.14	1.12	1.07	1.35	1.21

A titre de confirmation le P libéré par de l'ATPase du muscle a été dosé au cours de quelques essais: cette seconde méthode a donné les mêmes résultats que la précédente (Tableau IX), puisque l'enzyme ne libère que l'un des P de l'ATP.

TABLEAU IX
P LIBÉRÉ PAR L'ATPASE DU MUSCLE ($\gamma/100$ fragments)

Jours après l'énucléation	3	7	11
N	0.0055	0.0060	0.0063
A	0.0050	0.0051	0.0050
N/A	1.10	1.17	1.26

La publication d'une nouvelle méthode, rapide et spécifique, de dosage de l'ATP, basée sur la stimulation de la luminescence d'un extrait de lucioles (STREHLER ET BIBLIOGRAPHIE p. 267/268.

TOTTER²⁸), nous a incité à reprendre ces expériences, avec l'aide du Dr. M. ERRERA, qui a mis au point l'appareillage de mesure.

Technique: 200 fragments sont placés dans 75 μ l de milieu (CHALKLEY¹⁷) qu'on porte rapidement à l'ébullition. Dosages en double sur 30 μ l selon STREHLER ET TOTTER²⁸.

On trouvera ci-dessous les résultats moyens de ces expériences, au nombre de 6 pour les fragments de 1 jour, de 3 pour ceux de 4 j. et de 2 pour ceux de 9 j. (Tableau X).

TABLEAU X
ATP EN $\gamma/200$ FRAGMENTS

<i>Jours après l'opération</i>	1	4	9
N	0.057	0.076	0.051
A	0.058	0.069	0.0525
N/A	0.99	1.11	0.97

Si on calcule en ATP les résultats qui sont consignés aux Tableaux VIII et IX et si on les rapporte à 200 fragments, de façon à pouvoir les comparer aux données du Tableau X, on obtient des valeurs de l'ordre de 0.15 γ d'ATP/200 fragments; ces valeurs sont de 2 à 3 fois supérieures à celles que donne la méthode de STREHLER ET TOTTER²⁸. Cette différence tient sans doute à la présence de quantités importantes de métaphosphate dans les amibes: celles-ci contiennent, en effet, de nombreux granules métachromatiques et on sait (WIAME³⁵) que les métaphosphates, qui sont largement répandus chez les microorganismes, donnent une forte réaction métachromatique.

Quoiqu'il en soit, un fait inattendu ressort de l'examen du Tableau X: pour la première fois, nous trouvons une teneur égale en une substance dans les deux fragments. Or, comme nous l'avons déjà vu, le rapport N/A "normal" (volume, teneur en protéines) est de 1.1-1.2; le rapport N/A voisin de 1, que nous trouvons dans le cas de l'ATP, signifie donc que les *fragments anucléés sont relativement plus riches en ATP que les moitiés nucléées*. Il se produit donc une *accumulation d'ATP, en raison sans doute d'une utilisation imparfaite de cette substance en l'absence du noyau*; cette accumulation, notons-le, est précoce, puisqu'elle se manifeste dès le 1er jour après l'opération.

Il nous paraît plausible que cet enrichissement relatif en ATP des fragments anucléés soit lié aux troubles de la locomotion qui suivent l'énucléation: comme l'a montré KRISZAT³⁶ et comme nous avons pu le vérifier, l'addition à des amibes (ou à des fragments nucléés) de faibles quantités d'ATP (0.0005 M) leur fait rapidement prendre la forme sphérique caractéristique des moitiés anucléées.

Voyons maintenant ce qui se passe, toujours en ce qui concerne l'ATP, lorsque des fragments d'amibes sont soumis à des conditions anaérobiques ou à l'action d'inhibiteurs du métabolisme.

h. *Effets de l'anaérobiose et de quelques inhibiteurs du métabolisme sur la teneur en ATP des fragments.* Nous avons vu plus haut que, dans les fragments anucléés, les oxydations se maintiennent pendant longtemps à leur taux normal, bien que l'attaque des réserves glucidiques y soit rapidement déficiente. On peut dès lors s'attendre à voir les moitiés anucléées présenter une moindre capacité de maintien de leur teneur en ATP au niveau normal en l'absence d'air: si la glycolyse anaérobique est déficiente aussi, il est à prévoir que les fragments anucléés n'auront qu'une capacité limitée de production

anaérobiose de l'ATP. Les résultats ci-dessous (Tableau XI) montrent qu'il en est bien ainsi.

Technique: les fragments sont placés en anaérobiose en les plongeant dans le mélange glucos-oxydase-glucose-catalase de BENESCH ET BENESCH³⁷ (Chalkley contenant 0.3 % de glucose, glucos-oxydase selon BENESCH ET BENESCH³⁷). Les amibes se comportent, dans ce milieu, exactement comme si elles avaient été placées dans de l'azote purifié (KITCHING³⁸). Durée de l'anaérobiose: 16 h. Dosage de l'ATP selon STREHLER ET TOTTER²⁸.

TABLEAU XI
TENEUR EN ATP $\mu\text{g}/200$ FRAGMENTS

Jours après l'énucléation	N aérob.	N anaérob.	A aérob.	A anaérob.	Perte en anaérob. (%)	
					N	A
I	0.057	0.047	0.058	0.018	18	69
4-9	0.063	0.033	0.061	0.019	48	69

On voit (Fig. 8) que les fragments nucléés, s'ils n'ont pas été soumis à un jeûne prolongé, maintiennent, en anaérobiose, leur taux d'ATP à un niveau presque normal; lorsque ces fragments ont été laissés à jeûn pendant quelques jours, de telle sorte que leur capacité d'utiliser leurs réserves glucidiques ait diminué (*cf.* plus haut), l'anaérobiose provoque une chute beaucoup plus marquée de leur teneur en ATP. Mais, dans le cas des fragments anucléés, cette chute devient un véritable effondrement: *l'ablation du noyau a donc pour conséquence rapide une diminution massive de la capacité de maintenir, en anaérobiose, l'ATP sous sa forme phosphorylée.*

Mentionnons encore une série d'expériences, cohérentes mais moins satisfaisantes au point de vue technique parce que les poisons utilisés nécessitent l'introduction de corrections quand on emploie la méthode de STREHLER ET TOTTER²⁸, sur les effets de l'acide monoiodacétique (MIA) $10^{-3} M$, le NaF

$10^{-2} M$ et le dinitrophénol (DNP) $10^{-4} M$ sur la teneur en ATP des fragments d'amibes (Tableau XII). L'action des divers inhibiteurs durait une quinzaine d'heures et les fragments (de 1 à 3 jours) ne présentaient, à ce moment, que rarement de la cytolysé.

Il est probable que l'acide mono-iodacétique ne pénètre pas dans les amibes, ce qui expliquerait son inefficacité; quant au fluorure et au dinitrophénol, ils conduisent au même effet que l'anaérobiose: en présence de ces inhibiteurs, la teneur en ATP des fragments anucléés s'abaisse beaucoup plus que celle des moitiés nucléées.

Ces résultats confirment l'idée que le noyau jouerait un rôle dans les mécanismes de production anaérobique de l'ATP, c'est-à-dire, selon toute vraisemblance, dans la glycolyse. Abandonnant un instant les amibes, voyons si cette conclusion demeure valable dans le cas d'autres cellules, dont le noyau aurait été expérimentalement lésé: examinons, par exemple, le cas des œufs de grenouille qui ont été fécondés par des spermatozoïdes traités par une ypérite azotique (N_2H_4), dont nous avons récemment étudié en détails la cytologie et le métabolisme (BRACHET³⁹).

i. *La teneur en ATP d'embryons létal de grenouille en aérobiose et en anaérobiose.*

Bibliographie p. 267/268.

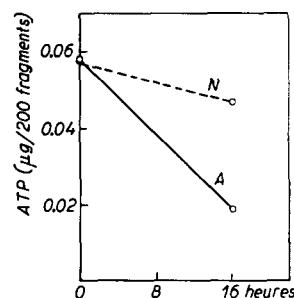


Fig. 8. Chute anaérobique de la teneur en ATP des fragments N et A (fragments de 1 j.).

Comme nous l'avons montré précédemment³⁹, la fécondation d'oeufs de grenouille par des spermatozoïdes traités par N_2H à 0.1-0.05% conduit, après une segmentation normale, à l'arrêt du développement au moment de la gastrulation. Nous avons comparé, en utilisant les techniques mises au point pour les amibes, la teneur en ATP de ces embryons létaux (qui ne se cytolysent pas avant 2 ou 3 jours) à celle de témoins normaux. Le Tableau XIII donne les teneurs en ATP en *aérobiose* pour les embryons létaux et les témoins pendant les 3 premiers jours de leur développement (moyennes de 3 à 6 expériences différentes, dosages en double).

TABLEAU XII
TENEUR EN ATP/ γ 200 FRAGMENTS

		$\%$ d'inhibition
Témoins	N 0.079	
	A 0.071	...
MIA	N 0.082	0
	A 0.067	6
NaF	N 0.066	17
	A 0.043	41
DNP	N 0.068	4
	A 0.032	56

On voit que le développement normal s'accompagne, à la gastrulation, d'une synthèse importante d'ATP et que, au 3^e jour, le blocage du développement s'accompagne d'une accumulation de cette substance: tout se passe, à nouveau, comme si l'ATP demeurait inutilisé dans les oeufs dont le développement s'est arrêté à cause d'une lésion nucléaire.

Les effets de l'anaérobiose, pendant respectivement 17 h et 8 h à 20° (méthode de BENESCH ET BENESCH³⁷, ou vide poussé), sur la teneur en ATP des deux types d'embryons sont consignés au Tableau XIV et sur la Fig. 9.

TABLEAU XIII
ATP EN γ /10 EMBRYONS (T: TÉMOINS. N_2H : LÉTAUX) EN AÉROBIOSE

Jours de développement	1		2		3	
	T (blast.)	N_2H (blast.)	T (gastr.)	N_2H (blast.)	T (neur.)	N_2H (blast.)
3.6	3.6	3.6	7.4	6.4	6.1	9.0

On voit que les embryons normaux et les létaux se comportent de façon identique chaque fois que la durée de l'anaérobiose est assez longue (17 h) pour bloquer le développement des témoins; par contre, une période brève (8 h) d'anaérobiose ne fait que ralentir le développement des témoins et leur teneur en ATP ne subit qu'une chute modérée; cette même période d'anaérobiose produit, dans le cas des létaux (N_2H), une diminution massive de la teneur en ATP. L'embryon léthal, comme l'avaient d'ailleurs déjà aperçu BARTH ET JAEGER⁴⁰, se caractérise donc, tout comme le fragment anucléé d'une amibe, par une *capacité diminuée de maintenir, en anaérobiose, l'ATP sous sa forme phosphorylée*.

Revenons maintenant aux amibes et voyons ce que devient leur composition enzymatique après l'énucléation.

j. *La composition enzymatique des fragments d'amibes.* Donnons, tout d'abord, la liste d'une série d'enzymes que nous avons recherchés en vain dans les amibes, soit qu'ils n'existent qu'à l'état de traces, soit qu'ils s'inactivent particulièrement rapidement après extraction: ce sont l'hexokinase, la phosphorylase, la guanase, la nucléoside-phosphorylase et l'enzyme qui catalyse la synthèse du diphosphopyridinenucléotide (DPN) à partir de l'ATP et du nucléotide de la nicotinamide. Cet échec est particulièrement regrettable, parce que les deux premiers jouent un rôle essentiel dans les stades initiaux du métabolisme glucidique (dont nous savons qu'il est déficient dans les fragments anucléés) et parce que les autres ont tendance à s'accumuler dans le noyau, en particulier dans le nucléole (MIRSKY *et al.*¹⁴, HOGEBOOM ET SCHNEIDER¹⁵ pour le foie de rat, BALTUS⁴¹ dans le cas des nucléoles des oocytes chez l'étoile de mer).

Les seuls enzymes à prépondérance nucléaire (MIRSKY *et al.*¹⁴, STERN ET MIRSKY⁴²) que nous avons pu déceler chez l'amibe sont l'adénosinedésaminase et l'érolase. Malheureusement, l'adénosinedésaminase, enzyme à localisation nucléaire dans le foie (MIRSKY *et al.*¹⁴), se trouve en quantités tellement faibles dans les amibes qu'une étude précise de sa localisation s'est avérée impossible par les techniques dont nous disposons.

Nous ne pourrons donc parler que de l'érolase qui, selon STERN ET MIRSKY⁴² serait concentrée dans le noyau par rapport au cytoplasme dans les embryons de blé; l'érolase a été dosée par une micro-adaptation de la technique de LOHMANN ET MEYERHOF²⁶, utilisée par STERN ET MIRSKY⁴².

Technique: 300-400 fragments provenant d'amibes à jeûn depuis 2-3 jours sont placés dans un volume minimum d'un mélange $MgCl_2$ 0.05 M dans $NaHCO_3$ 1 %. Cytolyse par congélation à la neige carbonique. On amène à 10 μl . Addition de 10 μl d'acide phosphoglycérique, en goutte séparée pour les témoins. Incubation 5 h à 36°. Précipitation par 10 μl d'acide trichloracétique 10 %. Centrifugation après 15 min. Dosages en double sur 10 μl d'extrait, addition de 30 μl NaOH N/5 et de 10 μl d'iode N/10. Après 20 min, addition de 7 μl HCl N et titration au thiosulfate N/20 en présence d'amidon.

Cette technique a été justifiée par des essais préliminaires, où on fait varier le nombre des amibes et la durée de l'incubation.

Les résultats (Tableau XIV et Fig. 10) ont été les suivants.

TABLEAU XIV

PERTE D'ATP EN %

Durée de l'anaérobiose	17 h	8 h
Embryons de 1 j.	T	62 %
	N_2H	62 %
Embryons de 2 j.	T	62 %
	N_2H	57 %
		37 %
		59 %

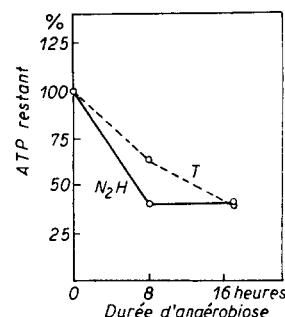


Fig. 9. Chute anaérobique de la teneur en ATP des œufs normaux (T) et létaux (N_2H).

On voit que, contrairement aux prévisions, l'érolase n'est *pas* accumulée dans le noyau de l'amibe (rapport N/A moyen voisin de 1.2) et que l'enzyme se maintient parfaitement, au cours du temps, dans le cytoplasme anucléé.

TABLEAU XV
ENOLASE ($\mu\text{l Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{N/20 POUR 100 FRAGMENTS}$)

Jours après l'énucléation	0	1	2	3	7	11
N	1.20	0.89	1.50	1.05	0.95	
A	0.98	0.69	1.42	1.42	0.80	
N/A	1.23	1.30	1.05	1.16	1.16	

Amylase. Cet enzyme, qui se trouve en abondance dans les amibes (HOLTER ET DOYLE⁴³), a été étudié dans notre laboratoire par URBANI⁴⁴. Le Tableau XVI et Fig. 10 rappellent l'essentiel de ses observations.

TABLEAU XVI
AMYLASE ($\mu\text{l Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{N/50 / 20 FRAGMENTS}$)

Jours après l'énucléation	0	1	2	3	6	7	9	11
N	3.3	5.1	4.7	4.5	5.9	5.4	4.5	4.2
A	2.9	9.4	9.9	7.1	4.7	5.2	4.2	3.6
N/A	1.14	0.55	0.55	0.63	1.25	1.04	1.09	1.16

Si la distribution initiale de l'enzyme entre le noyau et le cytoplasme est normale, un phénomène curieux se produit entre le 1er et le 3e jour après la section: on voit, en effet, l'activité enzymatique s'élever notablement dans les fragments anucléés, pour retomber ensuite à la normale.

La réalité de ce phénomène ne a semble pas faire de doute: URBANI⁴⁴ vérifié les données qu'il avait obtenues sur des fragments de 2 j. lysés par le froid ou homogénéisés mécaniquement.

Voici les résultats de ces expériences de contrôle, qui ont été effectuées à 4 reprises (Tableau XVII).

TABLEAU XVII
AMYLASE ($\mu\text{l Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{N/50 / 20 FRAGMENTS DE 2 JOURS}$)

	Fragments intacts	Cytolyse par le froid	Cytolyse mécanique
N	3.8	6.6	4.9
A	5.3	9.2	6.2
N/A	0.72	0.72	0.79

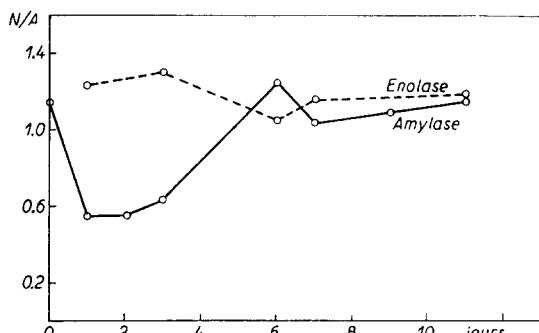


Fig. 10. Evolution du rapport N/A pour l'énoïlase et l'amylase.

La signification de ces résultats demeure obscure: les expériences de HOLTER ET DOYLE⁴³ ont montré que l'amylase est liée, chez l'amibe, à de gros granules assez aisément centrifugeables, qui correspondent sans doute aux mitochondries. Le fait que l'amylase ne disparaît pas des fragments anucléés, même au bout de 11 jours, confirme l'impression

que les mitochondries ne sont pas soumises à un contrôle strict du noyau. Quant à l'augmentation temporaire d'activité qui fait suite à l'énucléation, il se pourrait qu'elle soit due à une libération momentanée de l'enzyme lié aux mitochondries et qu'elle soit en rapport avec les troubles du métabolisme glucidique qui se manifestent à ce moment.

Protéase et dipeptidase. Ces deux enzymes ont été étudiés également par URBANI⁴⁵, parce que, selon HOLTER ET LØVTRUP²⁵, ils présenteraient une localisation différente dans l'amibe: alors que la protéase est, comme l'amylase, liée aux mitochondries, la dipeptidase est distribuée de façon homogène dans l'organisme.

Voici les résultats d'URBANI⁴⁵, qui n'avaient pas encore été publiés en détails: la dipeptidase a été dosée selon LINDERSTRØM-LANG ET HOLTER (*cf.* ²¹) et la protéase suivant HOLTER ET LØVTRUP²⁵; le Tableau XVIII donne la moyenne de ces déterminations et les résultats sont reproduits à la Fig. 11.

TABLEAU XVIII

A: DIPEPTIDASE EN $\mu\text{l HCl 0.06 N}$; B: PROTÉINASE, TYROSINE LIBÉRÉE						
<i>A. Jours après l'opération</i>	1	3	5	7	9	12-14
N	3.05	2.55	3.45	3.55	2.95	2.7
A	2.75	1.5	2.05	2.0	1.75	1.6
N/A	1.11	1.70	1.68	1.77	1.68	1.69
<i>B. Jours après l'opération</i>	1	3	5	7	9	12-14
N	0.72	0.74	0.74	0.75	0.67	0.59
A	0.67	0.71	0.67	0.73	0.63	0.52
N/A	1.07	1.04	1.10	1.03	1.07	1.14

On voit que la dipeptidase suit très exactement les variations de volume qui ont été décrites plus haut dans les deux types de fragments: ce résultat cadre parfaitement avec les conclusions de HOLTER ET LØVTRUP²⁵ sur le caractère ubiquitaire de cet enzyme. On n'observe d'accumulation dans le noyau ni pour la dipeptidase, ni pour la protéinase; en ce qui concerne cette dernière, on remarquera que son activité se maintient de façon identique dans les deux types de fragments au cours du jeûne: il faut en conclure que cet enzyme mitochondrial échappe tout particulièrement au contrôle du noyau.

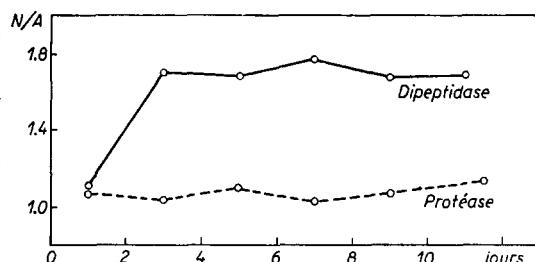


Fig. 11. Evolution du rapport N/A pour la dipeptidase et la protéase.

Phosphatases et adénosinetriphosphatase (ATPase). Nous n'avons trouvé, dans les amibes, qu'une seule phosphatase active sur le glycérophosphate; son optimum est acide (pH 5.5); elle n'est pas activée par les ions Mg^{++} et elle est fortement inhibée par NaI . L'enzyme est très actif et il peut être dosé sur 5 à 10 fragments. Dans le cas de l'ATPase, il importe de surveiller de près le pH et la concentration du substrat, et il faut opérer rapidement pour obtenir des résultats reproductibles.

Conditions expérimentales. Phosphatase: technique de KRUGELIS²². Incubation pendant 3 h à 40 en présence de glycérophosphate 5 mg/ml. 3 expériences indépendantes.

ATPase: micro-adaptation, à l'échelle de 4 μ l, de la technique de SWANSON⁴⁶. Incubation de 2 h à 18°. 3 expériences indépendantes.

Voici les résultats moyens de ces dosages (Tableau XIX et Fig. 12).

TABLEAU XIX
P LIBÉRÉ EN $10^{-3} \gamma/\text{FRAGMENTS. A: PHOSPHATASE; B: ATPASE}$

A. Jours après l'énucléation	1	3	5	7	10	12
N	0.4	7.4	6.7	4.8	7.0	6.8
A	5.2	5.5	4.6	1.9	3.0	1.4
N/A	1.23	1.34	1.45	2.53	2.33	4.85

B. Jours après l'énucléation	1	3	5	7	10	12
N	2.55	3.01	2.99	2.90	3.00	2.98
A	2.12	2.57	2.51	2.17	2.55	1.26
N/A	1.19	1.17	1.19	1.34	1.17	1.26

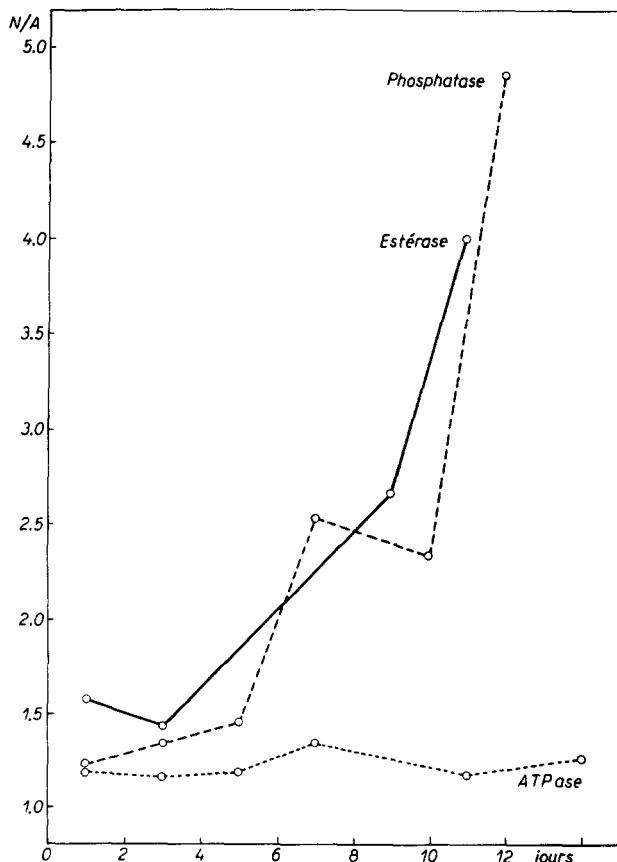


Fig. 12. Evolution du rapport N/A pour l'ATPase, la phosphatase acide et l'estérase.

Bibliographie p. 267/268.

On voit que ni l'une, ni l'autre des deux phosphatases étudiées n'est concentrée dans le noyau; mais le comportement des deux enzymes devient radicalement différent en l'absence du noyau: alors que l'ATPase, comme l'éno-lase, l'amylase et la protéase, se maintient fort bien dans le fragment anucléé, l'ablation du noyau entraîne une chute profonde de la phosphatase: à cet égard, cet enzyme se rapproche fortement de l'ARN.

Estérase. Terminons par un dernier enzyme, l'estérase, qui ne se trouve malheureusement qu'en très petites quantités dans les amibes, ce qui nuit à l'exactitude des mesures.

Technique: dosage selon GLICK²¹ sur 200 fragments. 5 h d'incubation. Une seule expérience en double.

Comme le montrent le Tableau XX et la Fig. 12, l'estérase semble se comporter, après l'énucléation, à peu près de la même manière que la phosphatase acide.

TABLEAU XX
ESTÉRASE EN μl D'HCl 0.005 N

<i>Jours après l'énucléation</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>9</i>	<i>11</i>
N	3.3	3.3	3.2	3.2
A	2.1	2.3	1.2	0.8
N/A	1.57	1.43	2.66	4.0

On remarquera qu'une proportion élevée de l'enzyme semble initialement localisée dans le noyau et on notera la disparition presque complète de l'enzyme dans le cytoplasme anucléé en quelques jours; toutefois, il convient de reconnaître que, dans le cas de l'estérase, nos dosages ne sont pas assez nombreux pour qu'on puisse en tirer des conclusions fermes.

DISCUSSION

Les résultats expérimentaux, qui viennent d'être exposés, sans prétendre donner une idée concrète du rôle biochimique du noyau cellulaire, permettent d'écartier quelques idées fausses et de préciser le problème.

Un premier point, qui ne nous retiendra pas, c'est qu'on peut définitivement exclure l'hypothèse, développée par LOEB¹¹ et reprise par CLARK³⁰, d'un rôle fondamental du noyau dans les oxydations cellulaires: les faits que nous avons observés sont parfaitement compatibles, au contraire, avec les idées actuelles sur l'intervention prépondérante des mitochondries dans les réactions productrices d'énergie.

Nous n'avons pas apporté non plus d'arguments en faveur de l'idée que le noyau serait le lieu où les enzymes s'accumuleraient ou se synthétiseraient: la distribution de tous les enzymes que nous avons étudiés, même celle de l'énolase (*cf.* STERN ET MIRSKY⁴²), semble être sensiblement uniforme dans l'amibe. La seule exception possible est l'estérase, qui paraît être accumulée dans le noyau: mais nous avons vu que les expériences faites à son propos ne sont pas suffisamment nombreuses pour qu'on puisse conclure de manière certaine.

Par contre, l'hypothèse d'une intervention du noyau dans la production de co-enzymes (BRACHET¹³, MIRSKY *et al.*¹⁴, HOGEBOOM ET SCHNEIDER¹⁵) et dans la glycolyse (BRACHET³⁹, STERN ET MIRSKY⁴², STERN ET TIMONEN⁴⁷) mérite d'être prise au sérieux: nos résultats actuels n'en apportent certes pas la preuve directe, mais les troubles précoces dans l'utilisation des glucides et l'effondrement en anaérobiose de la teneur en ATP des fragments anucléés que nous avons observés plaident certainement dans ce sens. Si, comme HOGEBOOM ET SCHNEIDER¹⁵ l'ont montré dans le foie, l'une des fonctions du noyau était la synthèse du DPN, une altération ou l'ablation du noyau devrait conduire à une "usure" progressive du DPN cytoplasmique. Il en résulterait des troubles du mécanisme glycolytique et une diminution de la capacité, pour le cytoplasme anucléé, de maintenir l'ATP sous sa forme phosphorylée. Une chute de la teneur en DPN ne conduirait pas nécessairement à une diminution des oxydations cellulaires si on admet, avec LEHNINGER⁴⁸, une indépendance du DPN des mitochondries — qui se maintiendrait en l'absence du noyau — vis-à-vis du DPN de l'hyaloplasme.

Le cytoplasme anucléé, tout comme celui des hybrides létaux, tend à accumuler

un excès d'ATP; cette accumulation est sans doute la conséquence de l'arrêt ou du ralentissement des nombreuses réactions de synthèse (celle du DPN par exemple) qui exigent de l'ATP pour se produire. Il est intéressant de noter à ce propos qu'une lésion du noyau par les U.V. (KANAZIR ET ERRERA⁴⁹) ou des R.X. (FORSSBERG ET KLEIN⁵⁰) provoque, comme l'énucléation, un enrichissement des cellules en ATP; par suite d'une utilisation imparfaite. Ajoutons que, dans le cas des *E. coli* irradiés aux U.V. étudiés par KANAZIR⁵¹, l'anaérobiose provoque, comme dans les fragments anucléés d'amibes, une chute exagérée et accélérée de la teneur en ATP.

Nos expériences actuelles ne nous permettent pas d'exprimer une opinion ferme sur le rôle éventuel du noyau dans la synthèse des protéines; ce sera d'ailleurs là l'objet du second travail de cette série, consacré à *Acetabularia*. Deux points émergent cependant dans nos observations présentes: tout d'abord, la chute de la teneur en ARN dans les fragments anucléés, qui a été confirmée par JAMES¹⁸, signifie certainement une atteinte, quantitative ou qualitative, des microsomes. L'importance de ces particules dans les synthèses protéiques est maintenant trop bien connue et trop bien établie pour que nous y revenions ici (cf. ALLFREY *et al.*⁵² par exemple, pour une démonstration récente de l'intervention de l'ARN des microsomes dans les synthèses protéiques du pancréas). La disparition rapide des microsomes dans un cytoplasme anucléé, qui ne signifie pas nécessairement que l'ARN de ces granules est issu du noyau, doit certainement avoir pour conséquence un arrêt de la synthèse des protéines: ainsi s'expliquerait aisément la perte rapide de toute capacité de régénération chez les organismes unicellulaires mérotomisés, à l'exception du cas unique d'*Acetabularia* que nous examinerons ailleurs.

Le second point concernant le rôle du noyau dans le métabolisme protéique est le suivant: nos dosages d'enzymes montrent incontestablement que le sort de diverses protéines spécifiques diverge après l'ablation du noyau. Certains enzymes se maintiennent intacts pendant de longs jours; d'autres, au contraire, disparaissent presque complètement du cytoplasme anucléé. Il ne fait donc pas de doute que les différentes protéines cytoplasmiques se trouvent placées à des degrés très inégaux, sous le contrôle du noyau. Il est tentant d'imaginer que ces différences sont dues à la localisation intracellulaire des divers enzymes: l'amylase et la protéase sont, chez l'amibe, liées aux mitochondries (HOLTER ET LOVTRUP²⁵, HOLTER ET POLLOCK³¹) et elles ne sont guère influencées par l'énucléation. Peut-être l'ATPase représente-t-elle, dans l'amibe comme dans le foie (NOVIKOFF *et al.*⁵³), un autre enzyme mitochondrial qui ne serait guère affecté par l'enlèvement du noyau. La dipeptidase, enzyme sans localisation précise dans l'amibe (HOLTER ET LOVTRUP²⁵), se comporte, en tous cas, tout autrement que les enzymes mitochondriaux: elle subit, en effet, une forte chute initiale dans les fragments anucléés. Enfin, on ne peut manquer d'être frappé par la ressemblance qui existe entre les comportements de la phosphatase acide et de l'estérase d'une part, celui de l'ARN de l'autre: si ces enzymes étaient, dans l'amibe, des constituants des microsomes ou de granules qui leur ressemblent, comme c'est le cas dans le foie (OMACHI *et al.*⁵⁴, NOVIKOFF *et al.*⁵⁵), on en arriverait à l'idée que l'enlèvement du noyau conduit à une élimination progressive des microsomes. Tout se passe donc, en définitive, comme si les mitochondries se trouvaient largement indépendantes du noyau tant en ce qui concerne leur activité que leur maintien; les microsomes seraient, au contraire, placés sous un contrôle nucléaire particulièrement étroit.

C'est pour nous un très agréable devoir de remercier ici tous ceux qui nous ont
Bibliographie p. 267/268.

aidés à réaliser la partie expérimentale de ce travail, en particulier le Prof. E. URBANI (Rome), Mmes N. LINET-FORREST et E. DE SAEDLEER, Melle E. BALTUS, J. BRYGIER et D. THOMASON.

RÉSUMÉ

L'évolution de fragments nucléés et anucléés d'amibes a été suivie, pour de nombreux constituants, par des méthodes cytochimiques et des techniques quantitatives: les principaux résultats sont les suivants:

1. Le cytoplasme anucléé perd rapidement sa capacité d'utiliser le glycogène, tandis qu'il consomme prématûrement ses protéines.

2. L'enlèvement du noyau provoque une diminution rapide et profonde de la teneur en ARN; elle n'exerce guère d'effets sur les oxydations cellulaires.

3. Le métabolisme phosphoré du cytoplasme anucléé est altéré: il s'y produit notamment une accumulation aérobie d'ATP et une diminution de la capacité de maintenir ce corps sous sa forme phosphorylée en anaérobiose.

4. L'énucleation exerce des conséquences très variables sur les divers enzymes du cytoplasme: certains d'entre eux ne sont pas affectés, alors que d'autres diminuent rapidement et fortement.

La signification biologique de ces résultats est brièvement discutée.

SUMMARY

Various constituents of nucleated and non-nucleated amoebae have been followed with cytochemical and quantitative methods. The main results are as follows:

1. Non-nucleated cytoplasm quickly loses its ability to utilize glycogen, while proteins are soon attacked.

2. Removal of the nucleus produces a quick and considerable drop in the RNA content, but exerts little influence on cellular oxidations.

3. Phosphorus metabolism is modified in non-nucleated cytoplasm: ATP accumulates in aerobic conditions and drops very quickly in the absence of oxygen.

4. Removal of the nucleus affects in different ways the enzymic constitution of the cytoplasm: some enzymes remain unaffected while others drop quickly and sharply.

The biological significance of these results is briefly discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung von Amoebenfragmenten mit und ohne Zellkern wurde durch Beobachtung von zahlreichen Konstituenten an Hand von zytochemischen Methoden und quantitativen Techniken verfolgt. Die wichtigsten Ergebnisse lauten:

1. Zytoplasma ohne Zellkern verliert schnell das Vermögen, Glykogen zu benutzen, während es andererseits seine Proteine zu früh verbraucht.

2. Die Entfernung des Zellkernes verursacht eine schnelle und tiefgehende Verringerung des Ribonukleinsäuregehaltes; die in der Zelle stattfindenden Oxydationen werden jedoch nicht betroffen.

3. Zytoplasma ohne Zellkern weist einen veränderten Phosphormetabolismus auf: man beobachtet besonders eine Anhäufung von ATP in Aerobiose, sowie ein verringertes Vermögen, in Anaerobiose die phosphorierte Form von ATP aufrechtzuerhalten.

4. Die Entfernung des Zellkernes übt sehr verschiedenartige Einflüsse auf die verschiedenen Enzyme des Zytoplasmas aus: einige sind davon unberührt, während andere schnell und stark absinken.

Die biologische Bedeutung dieser Ergebnisse wird kurz erörtert.

BIBLIOGRAPHIE

¹ A. CLAUDE, *Biol. Symposia*, 10 (1943) 111.

² J. BRACHET ET R. JEENER, *Enzymologia*, 13 (1944) 196.

³ H. CHANTRENE, *Enzymologia*, 13 (1944) 213.

⁴ G. H. HOGEBOOM ET W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 417.

⁵ V. ALLFREY, H. STERN, A. E. MIRSKY ET H. SAETREN, *J. Gen. Physiol.*, 35 (1952) 529.

⁶ A. L. DOUNCE, *Intern. Rev. Cytol.*, 3 (1954) 199.

- 7 C. DE DUVE ET J. BERTHET, *Intern. Rev. Cytol.*, 3 (1954) 225.
- 8 D. MAZIA, *Modern Trends in Physiology and Biochemistry*, Academic Press, Inc., New York, 1952.
- 9 J. BRACHET, *Le rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon*, Desoer, Liège, 1952.
- 10 J. BRACHET, *Colston Papers*, 7 (1954) 91.
- 11 J. LOEB, *Arch. Entwicklungsmech.*, 8 (1899) 689.
- 12 E. B. WILSON, *The Cell in Development and Heredity*, Mac Millan, New York, 1925.
- 13 J. BRACHET, *Nature*, 168 (1951) 205.
- 14 H. STERN, V. ALLFREY, A. E. MIRSKY ET H. SAETREN, *J. Gen. Physiol.*, 35 (1952) 559.
- 15 G. H. HOGEBOOM ET W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 187 (1952) 611.
- 16 T. CASPERSSON, *Naturwiss.*, 29 (1941) 33.
- 17 H. W. CHALKLEY, *Science*, 71 (1930) 442.
- 18 T. W. JAMES, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 367.
- 19 D. M. PRESCOTT ET D. MAZIA, *Biochim. Biophys. Acta*, (sous presse).
- 20 J. BRACHET, *Quart. J. Microscop. Sci.*, 94 (1953) 1.
- 21 D. GLICK, *Techniques of Histo- and Cytochemistry*, Interscience Publ., New York, 1949.
- 22 E. J. KRÜGELIS, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, 27 (1950) 273.
- 23 M. OGUR ET G. ROSEN, *Arch. Biochem.*, 25 (1950) 262.
- 24 E. G. BOETTIGER, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 27 (1946) 1.
- 25 H. HOLTER ET S. LÖVTRUP, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, 27 (1949) 27.
- 26 K. LOHMAN ET O. MEYERHOF, *Biochem. Z.*, 273 (1934) 60.
- 27 H. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 461.
- 28 B. J. STREHLER ET J. R. TOTTER, *Arch. Biochem.*, 40 (1952) 28.
- 29 N. LINET ET J. BRACHET, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 607.
- 30 A. M. CLARK, *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 20 (1942) 241.
- 31 H. HOLTER ET B. M. POLLOCK, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, 28 (1952) 221.
- 32 H. HOLTER ET E. ZEUTHEN, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, 26 (1948) 277.
- 33 D. MAZIA ET H. HIRSHFIELD, *Science*, 112 (1950) 297.
- 34 A. ROTHSTEIN, *Protoplasmatologia*, 2 (1954) E4.
- 35 J. M. WIAME, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1947) 234.
- 36 G. KRISZAT, *Arkiv. Zool.*, sér. 2, 6 (1953) 195.
- 37 R. E. BENESCH ET R. BENESCH, *Science*, 118 (1953) 447.
- 38 J. A. KITCHING, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 14 (1939) 227.
- 39 J. BRACHET, *Arch. biol. Liège*, 65 (1954) 1.
- 40 L. G. BARTH ET L. JAEGER, *Physiol. Zool.*, 20 (1947) 133.
- 41 E. BALTUS, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 263.
- 42 H. STERN ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1952) 181.
- 43 H. HOLTER ET W. L. DOYLE, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, 22 (1938) 219.
- 44 E. URBANI, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 108.
- 45 E. URBANI, *Arch. intern. physiol.*, 60 (1952) 190.
- 46 M. A. SWANSON, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 577.
- 47 H. STERN ET S. TIMONEN, *J. Gen. Physiol.*, 38 (1954) 40.
- 48 A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 345.
- 49 D. KANAZIR ET M. ERRERA, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 451.
- 50 A. FORSSBERG ET G. KLEIN, *Exp. Cell Research*, 7 (1954) 480.
- 51 D. KANAZIR, *Arch. intern. physiol.*, 62 (1954) 565.
- 52 V. ALLFREY, M. DALY ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 37 (1953) 157.
- 53 A. B. NOVIKOFF, L. HECHT, E. PODDER ET J. RYAN, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 153.
- 54 A. OMACHI, C. P. BARNUM ET D. GLICK, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 67 (1948) 133.
- 55 A. B. NOVIKOFF, E. PODDER, J. RYAN ET E. NOE, *J. Histochem. Cytochem.*, 1 (1953) 27.

Reçu le 19 mars 1955