

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

II. *ACETABULARIA MEDITERRANEA*

par

J. BRACHET, H. CHANTRЕНNE ET F. VANDERHAEGHE

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

I. INTRODUCTION\*

L'un de nous (BRACHET<sup>1</sup>) a essayé récemment d'analyser le rôle biochimique du noyau chez l'amibe en comparant, à divers points de vue, la composition de fragments nucléés et de moitiés anucléées chez cet organisme unicellulaire. Ces observations ont montré, notamment, que l'ablation du noyau n'exerce guère d'effets sur les oxydations cellulaires, mais qu'elle altère par contre les phosphorylations: la pénétration de <sup>32</sup>P, comme l'avaient déjà montré MAZIA ET HIRSHFIELD<sup>2</sup>, est fortement et rapidement inhibée dans les fragments anucléés; il s'y produit en même temps une accumulation aérobique d'acide adénosinetriphosphorique (ATP), mais la capacité de maintenir cette substance sous sa forme phosphorylée en anaérobiose est diminuée.

Par ailleurs, l'enlèvement du noyau provoque, toujours chez l'amibe, une chute rapide et profonde de la teneur en acide ribonucléique (ARN) du cytoplasme; en outre, il exerce des effets variables sur les divers enzymes du cytoplasme: certains d'entre eux ne sont pas affectés, tandis que d'autres diminuent rapidement et fortement. Il faut en conclure que, chez l'amibe, le noyau exerce un contrôle étroit sur l'ARN cytoplasmique et un contrôle variable sur les diverses protéines (enzymes) cytoplasmiques (BRACHET<sup>1</sup>).

Il nous a paru utile d'entreprendre une étude similaire sur un matériel entièrement différent de l'amibe, l'algue unicellulaire géante *Acetabularia mediterranea*: comme l'ont montré les recherches fondamentales de HÄMMERLING<sup>3,4</sup> et de ses collaborateurs, cette algue dont l'unique et volumineux noyau est situé dans l'un des rhizoïdes, se caractérise par l'extraordinaire capacité de régénération des fragments anucléés: les tiges isolées sont, en effet, capables d'amorcer à la lumière la formation des "chapeaux" (cf. Figs. 1, 2), qui servent normalement à la reproduction de l'algue (HÄMMERLING<sup>3,4</sup>). Cette importante régénération s'accompagne d'une augmentation de la taille, du poids humide et de la teneur en protéines des fragments

\* Les observations sur lesquelles le présent travail est basé ont fait l'objet de diverses notes préliminaires.

Bibliographie p. 562/563.

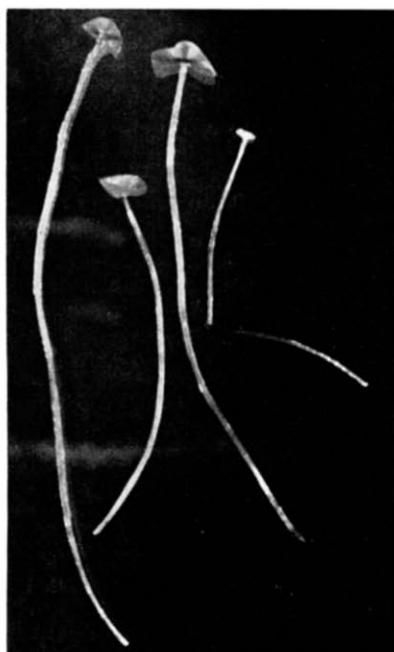


Fig. 1. Fragments anucléés. 6 semaines à la lumière. Formation de chapeaux.

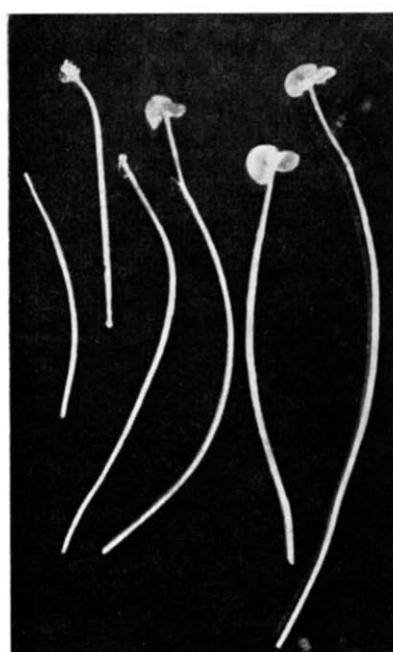


Fig. 2. Fragments anucléés. 2 semaines à l'obscurité, 6 semaines à la lumière. Formation normale de chapeaux.



Fig. 3. Fragments anucléés. 4 semaines à l'obscurité, 6 semaines à la lumière. Pas de chapeaux.

anucléés, comme l'a montré l'une de nous (F. VANDERHAEGHE<sup>5</sup>). Il semble donc que, chez *Acetabularia*, le cytoplasme anucléé soit capable de réaliser une synthèse nette de protéines; chez l'amibe, au contraire, l'ablation du noyau est suivie, à brève échéance, d'une diminution importante du volume et de la teneur en protéines (BRACHET<sup>1</sup>). Il ne faut pas s'étonner de trouver une différence aussi marquée: alors qu'un fragment anucléé d'amibe est incapable de se nourrir, la tige de l'*Acetabularia* est bourrée de chloroplastes et, par conséquent, le siège d'une active photosynthèse.

Nous allons donc examiner le métabolisme des fragments nucléés et anucléés d'*Acetabularia* à un triple point de vue: (1) Oxydations et phosphorylations; (2) Synthèse des protéines; (3) Evolution de l'ARN. Les résultats obtenus seront comparés à ceux qui ont été décrits pour d'autres cellules, au cours de la discussion finale.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les algues employées pour ces expériences ont été cultivées au laboratoire à partir de cystes recueillis à la Station zoologique de Villefranche sur Mer (grâce à l'amabilité du Directeur, M. TRÉGOUBOFF, que nous remercions vivement ici) et au Dramont (Var); des cystes provenant des cultures du Prof. J. HÄMMERLING ont pu être également utilisés, grâce à la générosité de celui-ci, qui a bien voulu accueillir l'une de nous (F.V.) dans son laboratoire et l'initier aux techniques de culture. Nous l'en remercions de tout cœur.

La culture des algues a été faite dans une chambre thermostatique maintenue à 22° C et éclairée à la lumière artificielle (tubes fluorescents Philips TL/29 L) pendant 14 h sur 24; le milieu de culture était de l'eau de la mer du Nord, stérilisée à l'autoclave et additionnée d'extrait de terreau, de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , 0.02 mg/ml et de  $\text{NO}_3\text{Na}$  0.1 mg/ml (Erdschreiberlösung). Les algues étaient brossées régulièrement au pinceau avant de les changer de milieu; avant les expériences, elles étaient généralement placées pendant 2-3 j. dans de l'eau de mer additionnée de streptomycine (100 mg/ml), puis cultivées pendant 1-2 j. dans des cristallisoirs stériles ou des boîtes de Roux afin de réduire au minimum la contamination bactérienne.

Lors de l'opération, les algues étaient coupées en deux au scalpel, soit en deux moitiés égales, soit au niveau du 1/3 inférieur. Les fragments n'étaient utilisés que 1 ou 2 jours après l'opération, afin de permettre leur cicatrisation.

Les *examens cytochimiques* ont été effectués sur des algues fixées au Zenker ou au mélange alcool-formol-acide acétique (6:3:1) de Serra; ils ont porté exclusivement, dans le présent travail, sur la répartition de l'ARN en suivant la technique décrite en détails par l'un de nous (BRACHET<sup>6</sup>), et sur celle de l'amidon (méthode de HORCHKISS<sup>7</sup>). On a eu recours aux techniques suivantes pour les *dosages quantitatifs*: la consommation d'oxygène et la photosynthèse ont été mesurées au Warburg; la teneur en azote protéique a été déterminée par la technique de Kjeldahl (suivant MARKHAM<sup>8</sup>) sur le résidu trichloracétique ou par la méthode indiquée ci-dessous à propos de la catalase.

L'incorporation des précurseurs radioactifs ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ) a été suivie au compteur de Geiger-Müller (Tracerlab): pour les mesures de l'incorporation du  $^{14}\text{CO}_2$  dans les protéines, on ajoutait 1.5-2  $\mu\text{C}$  de  $^{14}\text{CO}_2$  à 100-200 fragments dans 10-15 ml d'eau de mer. Après 24 h à la lumière, on éliminait le milieu radioactif, rinçait 2 fois à l'eau de mer et extrayait 3 fois à l'acide trichloracétique à 10%. Le précipité trichloracétique était hydrolysé par HCl 6 N, puis décarboxylé à la ninhydrine; le  $\text{CO}_2$  formé était recueilli sous la forme de  $\text{CO}_2\text{Ba}$ , dont on déterminait l'activité spécifique. Une technique similaire a été employée pour suivre l'incorporation de la glycine radioactive dans les protéines, en prenant la précaution de procéder à une décarboxylation à la ninhydrine des protéines, avant leur hydrolyse, afin d'éliminer l'acide aminé qui pourrait s'y être adsorbé.

L'acide orotique-2- $^{14}\text{C}$  a été synthétisé au laboratoire par le Dr. D. SZAFARZ et son incorporation a été mesurée dans l'ARN de la poudre sèche obtenue par précipitation trichloracétique et délipidation.

Le dosage de l'ARN dans les *Acetabularia* présente de grosses difficultés techniques, que n'ont pu être surmontées que par la mise au point d'une technique de dosage par dilution isotonique, due à D. SZAFARZ. En voici le principe: le précipité (3-10 mg de poids sec) obtenu en traitant les algues par l'acide perchlorique à 5% est délipidé et séché, puis additionné d'une quantité mesurée (215  $\mu\text{l}$ ) d'adénine-8- $^{14}\text{C}$  de radioactivité connue (121.533 c.m./ $\mu\text{M}$ ). On hydrolyse pendant 1 h à 100° avec HCl N pour libérer l'adénine de l'ARN. Après centrifugation, le surnageant de l'extrait chlorhydrique est évaporé à sec, repris dans 0.1 ml de HCl 0.1 N et chromatographié pendant 24 h, sur papier Whatman No. 1, avec un mélange butanol-ammoniaque 0.1 N (7:1). La tache de l'adénine est élue avec 0.3 ml d'HCl 0.1 N et on mesure l'absorption à 264  $\mu\text{m}$  au Beckman; un aliquot de 100-150  $\mu\text{l}$  est évaporé et la radioactivité est mesurée. Connaissant la radioactivité spécifique de l'adénine ajoutée ( $q_0$ ) et celle du mélange final ( $q$ ), il est aisément de calculer la quantité  $x$  de l'adénine de l'ARN par la formule  $x = a(q_0 - q)/(q)$ , où  $a$  est la quantité d'adénine-8- $^{14}\text{C}$  ajoutée.

Quant au dosage de la catalase, il a été exécuté de la façon suivante: les algues sont broyées dans un tampon de phosphate (pH 7.0), dont 2 ml sont introduits dans un manomètre de Warburg, contenant 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.5 M dans la corne latérale. L'un des manomètres renferme 0.1 mg/ml de catalase cristallisée pour déterminer la quantité exacte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilisée. Les mesures, qui sont exécutées à 22°, sont effectuées de 5 en 5 minutes pendant 35 min. L'activité catalasique est exprimée en divisant la constante de vitesse de la réaction par la teneur en N protéique (en  $\mu\text{g}$ ). Celle-ci est déterminée en précipitant 1 ml de l'extrait d'algues par 1 ml d'acide trichloracétique à 20%; après centrifugation et lavage à l'acide trichloracétique à 10% (2 fois) et à l'éther (2 fois), le précipité est hydrolysé pendant 15 h à 130° par HCl 6 N en tube scellé. L'hydrolysat est évaporé à sec, repris dans 1 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  et l'azote aminé est dosé à la ninhydrine selon MOORE ET STEIN<sup>9</sup> en utilisant de la glycine comme étalon. Dans quelques expériences, la catalase a été dosée par la méthode au titane, telle qu'elle a été décrite par l'un de nous (CHANTRENNE<sup>10</sup>).

## III. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

## A. Observations cytochimiques

Dans l'algue normale et dans les fragments nucléés en voie de régénération, le gros de l'ARN est accumulé, comme l'a montré aussi STICH<sup>11</sup>, dans le volumineux nucléole (Fig. 4). Le cytoplasme environnant, c'est-à-dire celui des rhizoïdes, présente également une forte basophilie, due à la présence d'ARN; celui-ci est mélangé aux grains d'amidon qui sont nombreux et volumineux dans cette région. De façon très générale, le rhizoïde qui contient le noyau présente une teneur plus élevée en ARN que les autres. Dans les tiges, les chloroplastes ne présentent qu'une basophilie modérée et les grains d'amidon y sont de petite taille; toutefois la basophilie augmente à l'extrémité des tiges, surtout au moment où le chapeau est en voie de formation et de croissance. Ces constatations apportent de nouveaux arguments aux idées de CASPERSSON<sup>12</sup> et de BRACHET<sup>13</sup>, qui attribuent à l'ARN un rôle important dans la synthèse des protéines.

On doit à STICH<sup>11</sup> la démonstration d'un fait important: c'est que la morphologie et la teneur en ARN du nucléole d'*Acetabularia* sont influencées par les conditions énergétiques existant dans le cytoplasme: la suppression prolongée de la photosynthèse, obtenue en maintenant des algues pendant plusieurs semaines à l'obscurité, transforme le nucléole boudiné et très basophile en une masse sphérique, fortement vacuolisée et pauvre en ARN. Nous avons retrouvé ce résultat en utilisant d'autres moyens pour réduire la production d'énergie dans le cytoplasme: on y parvient aisément en plaçant les algues dans des solutions d'inhibiteurs des phosphorylations oxydatives (dinitrophénol  $10^{-4}$  à  $10^{-5} M$ , usnate de Na 1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) pendant quelques



Fig. 4. Noyau normal d'*Acetabularia*. Nucléole très basophile en boudin. Unna.



Fig. 5. Noyau d'une *Acetabularia* traitée par l'usnate de Na (1 mg/ml pendant 2 semaines). Nucléole sphérique, vacuolisé, pâle à l'Unna.

jours. Les Figs. 4 et 5 en donnent un exemple, obtenu en traitant des *Acetabularia* par l'usnate (1 µg/ml) pendant 2 semaines. Il est à noter que les inhibiteurs des phosphorylations oxydatives que nous avons utilisés empêchent la croissance des algues normales et la régénération des fragments, qu'ils soient ou non pourvus du noyau; en outre, ces inhibiteurs augmentent plutôt qu'ils ne diminuent la basophilie des rhizoïdes et surtout celle du suc nucléaire. Il se pourrait donc que le blocage des phosphorylations oxydatives, chez *Acetabularia*, inhibe la synthèse des protéines sans toucher au même degré celle de l'ARN: tout se passe comme si ce dernier n'était pas utilisé de façon normale pour les synthèses protéiques quand la production d'énergie est diminuée au sein de la cellule; il semble qu'un déséquilibre entre la teneur en ARN des divers constituants cellulaires (nucléole, suc nucléaire, cytoplasme) s'établisse dans ces conditions.

Un autre moyen commode de produire les modifications de forme et de basophilie que STICH<sup>11</sup> a décrites dans les nucléoles d'*Acetabularia* consiste à placer les algues en anaérobiose et à l'obscurité pendant 1-2 jours; dans ce cas encore, la basophilie du suc nucléaire s'élève tandis que celle du nucléole s'abaisse. Tous ces faits indiquent que, comme l'a noté STICH<sup>11</sup> et comme le montrent déjà les expériences de A. BRACHET<sup>14</sup> sur la "mise à l'unisson" des spermatozoïdes qui ont pénétré dans des œufs d'oursin imparfaitement mûrs, *l'état physiologique du cytoplasme conditionne la morphologie et la composition chimique du noyau*.

Il est à noter que les agents qui touchent surtout les acides nucléiques, et non plus les mécanismes de production d'énergie du cytoplasme, ne causent que rarement et tardivement les anomalies caractéristiques des nucléoles que STICH<sup>11</sup> a décrites dans les algues placées à l'obscurité: ni la trypaflavine qui, à la concentration de 1:10,000, inhibe la régénération des fragments nucléés et anucléés (STICH<sup>15</sup>), ni la streptomycine (même à des concentrations aussi élevées que 2-10 mg/ml), ni les rayons U.V. à 2.537 Å ne provoquent autre chose qu'une vacuolisation du nucléole; celui-ci conserve d'habitude une basophilie intense. Ajoutons, à ce propos, que la streptomycine, aux fortes doses, inhibe complètement la croissance des algues, sans qu'on observe d'effet létal différentiel entre les deux types de fragments; aucune altération des chloroplastes n'est visible non plus. Au contraire, les U.V. sont, à dose égale, nettement plus létaux pour les fragments anucléés que pour les autres; jamais nous n'avons observé de régénération dans les fragments anucléés irradiés, quand ils ont survécu à des doses létales pour la majorité de ces fragments. Par contre, les fragments nucléés sont capables de régénérer dans ces conditions, mais après un temps de latence appréciable: il semble donc que les rayons U.V. détruisent certaines substances indispensables à la régénération et que ces substances ne puissent se reconstituer en l'absence du noyau.

## B. Mesures quantitatives

### 1. Consommation d'oxygène, photosynthèse et pénétration du radio-phosphore

#### a. Consommation d'oxygène

Quatre séries d'expériences, portant sur des algues prises à des stades variables de leur croissance, ont montré que la consommation d'oxygène des fragments anucléés (A) augmente lentement au cours du temps; les fragments nucléés (N) évoluent de la même manière, sauf que leur consommation d'oxygène, exprimée par fragment,

s'élève davantage en fin d'expérience: leur régénération s'intensifie d'ailleurs à ce moment alors qu'elle a cessé dans les tiges anucléées.

Le Tableau I et la Fig. 6 représentent, à titre d'exemple, une expérience typique.

TABLEAU I  
CONSOMMATION D'OXYGÈNE EN  $\mu\text{l}/25$  FRAGMENTS ET PAR HEURE

Temps en semaines	1	2	3	4	5	6	7	8
N	5.3	5.2	5.6	6.0	7.2	6.7	8.7	10.6
A	4.4	4.8	5.7	5.4	6.8	6.3	6.0	6.7
N/A	1.20	1.08	0.98	1.10	1.06	1.06	1.5	1.58

Ces résultats montrent que, chez *Acetabularia* comme chez l'amibe (BRACHET<sup>1</sup>), le taux de la consommation d'oxygène est largement indépendant de la présence ou de l'absence du noyau. Cette conclusion se voit renforcée par des expériences où l'effet de la trypaflavine (qui inhibe la régénération des deux types de fragments, selon STICH<sup>15</sup>) a été suivie sur la respiration de fragments nucléés et anucléés: quels que soient la nature des fragments et l'âge des algues, la trypaflavine (1:10,000) ne provoque pas d'inhibition en 3-5 heures; mais un traitement des fragments à la trypaflavine

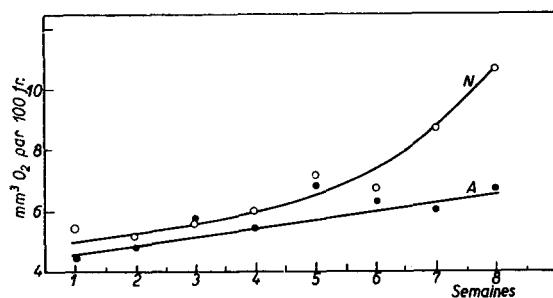


Fig. 6. Consommation d'oxygène des fragments nucléés (N) et anucléés (A) en fonction du temps écoulé depuis la section.

pendant 4 jours cause une inhibition importante, dépassant 60%, des oxydations cellulaires. Cette inhibition est lentement réversible (en 2 à 3 semaines) après lavage et report des fragments dans de l'eau de mer.

Toutefois, une différence intéressante apparaît entre les deux types de fragments lorsqu'on mesure leur consommation d'oxygène dans de l'eau de mer additionnée de  $\text{CO}_3\text{NaH}$ : alors que la respiration des fragments nucléés n'est pas modifiée lorsqu'on augmente la teneur en  $\text{CO}_3\text{NaH}$  du milieu, celle des tiges anucléées subit une inhibition considérable dès que cette teneur dépasse  $1 \cdot 10^{-2} M$ . Le Tableau II, où tous les chiffres se rapportent aux mêmes fragments, en fournit un exemple: il s'agissait d'algues opérées depuis 14 jours, la section ayant été faite au 1/3 inférieur de la tige.

TABLEAU II  
CONSOMMATION D'OXYGÈNE DES FRAGMENTS N ET A EN PRÉSENCE DE  $\text{CO}_3\text{NaH}$   
( $\mu\text{l O}_2/\text{FRAGMENTS/HEURE}$ )

Teneur en $\text{CO}_3\text{NaH}$	40 fragments N	30 fragments A
$1 \cdot 10^{-2} M$ (pH 7.2)	13.8	19.1
$2 \cdot 10^{-2} M$ (pH 7.5)	15.6	3.6

Les raisons de cette différence, qui indique peut-être une atteinte du cycle tri-Bibliographie p. 562/563.

carboxylique dans les fragments anucléés, mériteraient d'autant plus d'être étudiées à fond, que le phénomène s'observe déjà le lendemain de la section.

### b. Photosynthèse

*Technique.* Mesures manométriques de la production d'oxygène à la lumière et de son absorption à l'obscurité. Mesures de 10 en 10 min à 25° pendant 1 h à la lumière, 1 h à l'obscurité, 1 h à la lumière, sur 60 fragments. Eau de mer contenant  $1.5 \cdot 10^{-2} M$  de  $CO_3 \cdot NaH$ . Atmosphère: air 95 %,  $CO_2$  5 %. Dosage de l'azote protéique selon MOORE ET STEIN<sup>9</sup>.

Comme le montre le Tableau III, qui correspond à la moyenne de plusieurs expériences, il n'y a pas de différence significative dans l'activité photosynthétique des deux types de fragments, même après 4 semaines.

TABLEAU III

ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE DES DEUX TYPES DE FRAGMENTS:  
 $\mu l O_2$  PRODUITS PAR LA PHOTOSYNTHÈSE (COMpte TENU DE L' $O_2$  CONSOMMÉ PAR LA RESPIRATION)/  
 HEURE/ $\mu M$  D'ACIDE AMINÉ DES PROTÉINES

Jours après la section	2	7	12	16	26
N	5.7	3.0	8.0	8.0	6.3
A	4.2	4.8	5.8	7.5	6.8
N/A	1.35	0.63	1.38	1.07	0.93

### c. Pénétration de $^{32}P$

*Technique.* Incubation dans de l'eau de mer contenant 10  $\gamma$  de phosphate radioactif, donnant une activité de 13,700 c.m./ml, pendant 1 h 30 min à la lumière. 3 lavages au phosphate ordinaire avant le comptage.

L'incorporation est linéaire dans les algues entières jusque 114 h. Les expériences ont été peu nombreuses dans le cas des fragments et elles ont surtout porté sur des algues de deux lots (jeunes et âgées) qui avaient été opérées depuis un temps considérable (3 mois). Dans ces conditions, on observe (Tableau IV) une différence marquée dans le cas des algues jeunes, modérée dans celui des algues âgées dont beaucoup avaient régénéré un chapeau.

TABLEAU IV

INCORPORATION DU  $^{32}P$  EN c.m./mg POIDS SEC (MOYENNE DE 2 EXP.)

Algues jeunes	N: 123	A: 22	N/A: 5.6
Algues âgées	N: 89	A: 55	N/O: 1.6

Dans une autre série d'expériences, des algues intactes ont été mises dans du  $^{32}P$  et coupées en deux après des incubations de temps variable: comme le montre le Tableau V, une nette accumulation de  $^{32}P$  se produit dans les rhizoïdes (qui contiennent le noyau) au bout de 3 h.

Au cours d'un autre essai, nous avons constaté que l'incorporation du  $^{32}P$  est identique dans des fragments anucléés de 1 jour et dans les tiges des mêmes algues, qui étaient restées fixées au rhizoïde (tiges "nucléées"); par contre, les rhizoïdes eux-mêmes présentaient, par fragment, une activité 2.6 fois plus élevée que les tiges qui leur faisaient suite (durée de l'incorporation: 1 h 30).

TABLEAU V

INCORPORATION DU  $^{32}\text{P}$  EN c.m./mg POIDS SEC

Durée de l'incubation	Rhizoides	Tige	Rh/T
1 h 15	1.75	1.95	0.90
2 h 15	3.25	2.47	1.33
3 h 30	5.34	2.16	2.30
5 jours	54.2	21.2	2.56

Ces résultats indiquent que la pénétration du  $^{32}\text{P}$  est plus rapide dans le rhizoïde que dans la tige; ils concordent avec ceux qui ont été publiés par STICH ET HÄMMERLING<sup>16</sup>, qui n'ont pas observé de différences marquées dans la pénétration du  $^{32}\text{P}$  entre les deux types de fragments, jusqu'à 4 semaines après l'opération; ces auteurs ont montré, en outre, (STICH ET HÄMMERLING<sup>17</sup>) qu'une incorporation importante se produit dans le nucléole.

Toutefois, ces données ne peuvent être interprétées de façon valable que si on connaît la teneur en P des différentes régions de l'algue afin de déterminer leur radioactivité spécifique: nos dosages ont indiqué que le rhizoïde contient environ 2 fois plus de P total que la tige ( $\text{N/A} = 2.1$ ). Dans ces conditions on doit conclure que la diminution massive et rapide de la pénétration du  $^{32}\text{P}$  qui suit l'énucléation chez l'amibe (MAZIA ET HIRSHFIELD<sup>2</sup>; BRACHET<sup>1</sup>) fait défaut chez l'*Acetabularia*.

#### d. ATP et métaphosphates

La même conclusion vaut pour l'ATP: on ne retrouve, chez *Acetabularia*, ni l'accumulation aérobie d'ATP, ni l'effondrement de la teneur en ATP qui s'observe en anaérobiose dans les amibes anucléées (BRACHET<sup>1</sup>). Les techniques de dosage de l'ATP et de mise en anaérobiose étaient les mêmes que celles qui ont été employées chez l'amibe (BRACHET<sup>1</sup>).

Pour des algues opérées depuis une semaine, nous avons trouvé une teneur identique en ATP dans les deux types de fragments; un séjour en anaérobiose, à l'obscurité, pendant 40 h, n'a fait diminuer cette teneur que de 10-15%. Notons cependant que ces fragments, à l'inverse de ceux d'amibes, étaient en pleine régénération au moment du dosage: il est bien possible que des tiges anucléées, quand elles ont été isolées depuis longtemps et qu'elles ne peuvent plus former de chapeau, donneraient des résultats tout différents.

Cette réserve est d'autant plus justifiée que des dosages effectués dans notre laboratoire, en employant la même méthode que nous, par Mlle D. NEUGNIOT, montrent qu'il se produit une accumulation massive d'ATP dans les fragments anucléés, à condition que le milieu soit enrichi en adénine (10  $\gamma$  d'adénine/ml) et en acide indolacétique (0.1  $\gamma$ /ml): en effet, pour des fragments isolés depuis 3 semaines et cultivés dans ce milieu enrichi, D. NEUGNIOT a trouvé 0.47  $\gamma$  d'ATP/g de poids sec pour les fragments anucléés et 5.16  $\gamma$  d'ATP/g de poids sec pour les fragments anucléés ( $\text{N/A} = 0.1$ ). Dans le milieu normal, dépourvu d'adénine, les valeurs obtenues par D. NEUGNIOT, pour des fragments de 3 semaines, étaient seulement de 0.02  $\gamma$ /g de poids sec pour les nucléés et de 0.04  $\gamma$ /g de poids sec pour les anucléés ( $\text{N/A} = 0.2$ ).

On doit à STICH<sup>18</sup> d'avoir attiré l'attention sur l'abondance des métaphosphates, décelables cytochimiquement par leur métachromasie, dans les *Acetabularia*: selon

cet auteur, les métaphosphates, dont la concentration ne se trouverait pas sous le contrôle du noyau, diminueraient quand les algues sont placées à l'obscurité; ils s'accumuleraient, au contraire, lorsque la croissance est arrêtée par la trypaflavine. Nos propres observations cytochimiques nous ont montré une accumulation marquée des métaphosphates chaque fois que les synthèses sont arrêtées ou ralenties; l'inhibition des mécanismes producteurs d'énergie par le dinitrophénol, l'usmate ou l'anaérobiose entraîne une augmentation du nombre et de la taille des grains métachromatiques, au même titre que la trypaflavine, la streptomycine et les U.V. Il faut en conclure, croyons-nous, que l'accumulation des métaphosphates ne représente qu'un signe de souffrance de l'algue, auquel on ne peut attribuer de signification spécifique\*.

## 2. Métabolisme protéique

### a. Azote protéique et azote acidosoluble

Il a été montré précédemment par l'une de nous (VANDERHAEGHE<sup>5</sup>) qu'un fragment anucléé d'*Acetabularia* est encore capable de faire une synthèse nette de protéines. Nous avons eu l'occasion de reprendre la question à propos d'un travail récent de GIARDINA<sup>19</sup>, qui a montré que le rapport  $\frac{N \text{ protéique}}{N \text{ non protéique}}$  diminue beaucoup plus fortement dans les fragments anucléés que dans les autres: GIARDINA<sup>19</sup> en a conclu que le maintien de certaines protéines est fortement influencé par le noyau chez *Acetabularia*.

Au cours de 3 séries d'expériences, où la teneur en N acidosoluble et en N protéique a été comparée, nous avons constaté que les résultats de GIARDINA<sup>19</sup> et ceux de VANDERHAEGHE<sup>5</sup> sont tous deux corrects: il se produit simultanément une augmentation de la teneur en azote soluble et en azote protéique dans les deux types de fragments. Mais la synthèse des composés acidosolubles est plus importante, au cours du temps, dans les fragments anucléés que dans les autres, de telle sorte que le rapport  $\frac{N \text{ prot.}}{N \text{ soluble}}$  y diminue davantage.

*Technique.* 30-40 fragments lavés à l'eau distillée sont précipités à l'acide trichloracétique à 10% et lavés 2 fois avec ce même acide à 5%. Dosage du N total (Kjeldahl) ou du N aminé (MOORE ET STEIN<sup>9</sup>) sur le surnageant. Le précipité est délipidé à l'alcool-éther et le N est dosé par les mêmes techniques.

Le Tableau VI et les Figs. 7 et 8 représentent une expérience typique, réalisée sur des algues de taille moyenne dont beaucoup n'ont pas formé de chapeaux au cours de l'expérience.

TABLEAU VI  
N PROTÉIQUE (NP) ET N SOLUBLE (NS) DANS LES FRAGMENTS  
( $\mu M$  d'acides aminés)

Temps en jours	2	12	17	26
N	NS	0.29	0.35	0.45
	NP	0.90	1.2	1.5
	NP/NS	3.4	3.4	3.3
A	NS	0.45	0.80	1.0
	NP	0.99	1.25	1.25
	NP/NS	2.2	1.6	1.25

\* Nous avons considéré comme métaphosphates tous les granules métachromatiques à la pyronine; l'emploi de méthodes plus spécifiques et quantitatives conduirait peut-être à une révision de nos conclusions.

On voit que, comme l'avait signalé GIARDINA<sup>19</sup>, la synthèse du N soluble, qui correspond sans doute surtout à des acides aminés libres, est plus rapide dans les

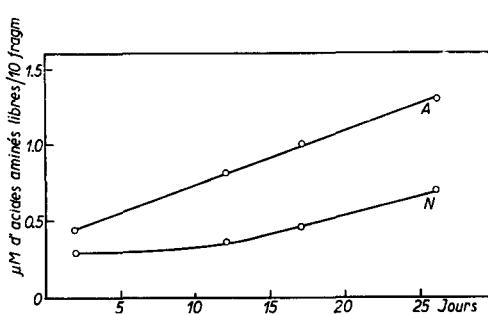


Fig. 7. Evolution du N soluble dans les fragments N et A en fonction du temps écoulé depuis la section.

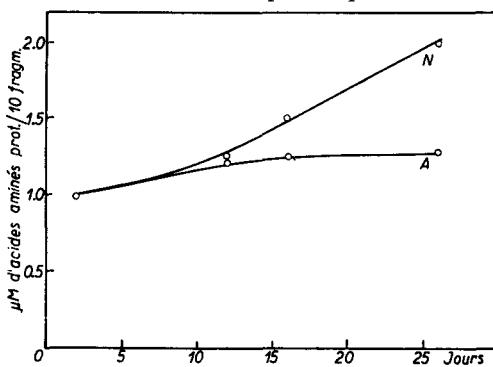


Fig. 8. Evolution du N protéique dans les fragments N et A en fonction du temps écoulé depuis la section.

fragments anucléés que dans les autres; mais, simultanément, il se produit une synthèse de protéines aussi importante dans la tige anucléée que dans les rhizoïdes pendant les 2 premières semaines. A ce moment, la synthèse protéique s'arrête dans les fragments anucléés.

Si, comme ce fut le cas dans l'expérience du Tableau VII et de la Fig. 9, on dose les protéines dans des algues opérées juste au moment de la formation du chapeau

TABLEAU VII

<i>Jours après la section</i>	2	5	7	10	13	18	27	39	
γ N protéique	Nucléés	64.1	78.6	83.4	100.0	109.9	158.8	186.2	219.240.0
pr 100 fragments	Anucléés	81.0	136.9	137.1	169.0	222.6	249.4	246.4	278.0
		92.5	137.7	127.7	—	188.6	245.4	254.4	—

et fortement éclairées, c'est-à-dire traitées de manière à obtenir une régénération maximale de chapeaux dans les tiges anucléées, on constate que *la synthèse protéique est nettement plus intense dans les tiges dépourvues de noyau que dans les rhizoïdes* pendant les premiers jours qui suivent l'opération; mais cette synthèse se ralentit par la suite.

Les résultats de ces expériences, qui démontrent que la synthèse protéique est initialement plus rapide dans les tiges

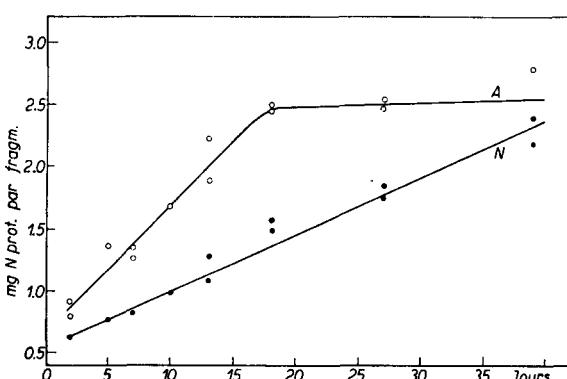


Fig. 9. Evolution du N protéique dans les fragments N et A en fonction du temps écoulé depuis la section; conditions optimales de régénération.

anucléées que dans les rhizoïdes, sont en bon accord avec les observations biologiques de BETH<sup>20</sup>: il a établi que la présence du noyau, chez *Acetabularia*, exerce un effet inhibiteur sur la formation du chapeau. Des expériences biologiques simples vont nous permettre de déterminer au bout de combien de temps le cytoplasme anucléé perd la capacité de former un chapeau.

b. *Influence de la lumière et de l'obscurité sur la régénération des fragments anucléés*

On doit à BETH<sup>21</sup> la démonstration de la nécessité d'un fort éclairage pour obtenir la formation de chapeaux, qu'il s'agisse de fragments anucléés ou d'algues intactes. Ces observations nous ont incités à suivre la capacité de régénérer des chapeaux chez des fragments anucléés qui avaient été placés à l'obscurité pendant des temps variables, allant de 1 à 4 semaines, avant d'être mis à la lumière.

Le Tableau VIII donne les résultats obtenus au cours de 2 expériences d'une durée totale de 10 semaines (4 semaines à l'obscurité au maximum, 6 semaines à la lumière au minimum), tandis que les Figs. 1, 2 et 3 illustrent ces résultats.

TABLEAU VIII  
RÉGÉNÉRATION DE FRAGMENTS ANUCLÉÉS MAINTENUS À L'OBSCURITÉ  
PENDANT DES TEMPS VARIABLES

Durée du séjour à l'obscurité	Nombre de fragments anucléés	Nombre de chapeaux
0	40	21 (52 %)
1 sem.	40	18 (45 %)
2 sem.	40	19 (48 %)
3 sem.	40	12 (30 %)
4 sem.	40	0 (0 %)

On voit qu'un séjour de 2 semaines à l'obscurité ne réduit pas sensiblement la fréquence des chapeaux régénérés; cette fréquence s'abaisse fortement lorsque les fragments sont conservés pendant 4 semaines à l'obscurité. Si on compare ces résultats avec ceux qui ont été décrits plus haut au sujet de la synthèse des protéines dans les fragments anucléés, on constate qu'il existe un parallélisme satisfaisant entre les deux phénomènes: il faut en conclure que l'épuisement des substances d'origine nucléaire qui sont nécessaires à la régénération se fait à une vitesse sensiblement égale à lumière et à l'obscurité, c'est-à-dire, dans des conditions très différentes en ce qui concerne la production d'énergie dans le cytoplasme.

Ces résultats nous ont incités à étudier, de façon comparée, l'incorporation du  $^{14}\text{CO}_2$  et du glycocolle- $\text{I}^{14}\text{C}$  dans les protéines des *Acetabularia*, tant à la lumière qu'à l'obscurité.

c. *Incorporation du  $\text{CO}_2$  et du glycocolle radioactifs*

Des expériences préliminaires ont montré que l'incorporation du  $\text{CO}_2$  et du glycocolle dans les protéines est linéaire pendant au moins 48 h. Les durées d'incubation dans les expériences ci-dessous étaient généralement de 24 h.

On trouvera au Tableau IX et sur la Fig. 10 le résumé des résultats obtenus dans le cas de l'incorporation du  $^{14}\text{CO}_2$  dans les protéines à la lumière; chaque résultat correspond à la moyenne de 3 ou 4 dosages.

TABLEAU IX  
INCORPORATION DU  $^{14}\text{CO}_2$  DANS LES PROTÉINES  
Activité spécifique en  $\mu\text{M}$  de  $\text{CO}_2$

Jours après l'opération	9	11	16	23	33	38	41	48
N	197	245	159	220	192	148	166	142
A	202	250	145	133	131	95	74	60
N/A	0.97	0.98	1.09	1.67	1.47	1.56	2.22	2.38

On voit que l'incorporation du  $^{14}\text{CO}_2$  dans les protéines se *produit à une vitesse parfaitement normale pendant les deux semaines* qui suivent l'opération, c'est-à-dire au moment où la capacité de régénération des fragments anucléés est encore intacte;

elle diminue vers la 3e semaine, pour s'abaisser considérablement à la 6e. Ces expériences confirment donc entièrement les résultats obtenus lors du dosage de la teneur en protéines et lors des expériences biologiques sur les deux types de fragments.

Des expériences faites sur des algues entières ont précisé que l'incorporation de  $^{14}\text{CO}_2$  dans les protéines n'est importante qu'à la lumière: elle diminue de 15 à 25 fois dans les algues maintenues à l'obscurité. La conclusion qu'il convient d'en tirer, à savoir que l'incorporation est étroitement liée à la photosynthèse, s'est vue confirmée

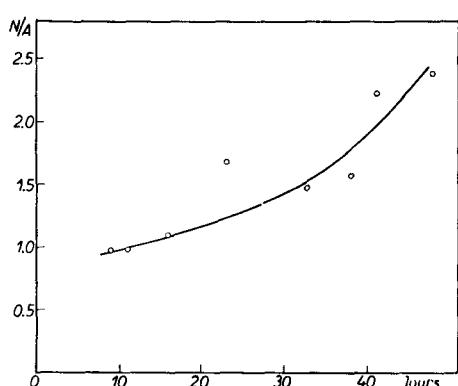


Fig. 10. Evolution du rapport N/A, en fonction du temps écoulé depuis la section, pour l'incorporation de  $^{14}\text{CO}_2$  dans les protéines.

par des expériences de courte durée (2 h) où les chloroplastes et les microsomes des algues entières, ou des fragments, ont été séparés par centrifugation fractionnée (respectivement à 800 g pendant 10 min et 140,000 g pendant 50 min) après homogénéisation dans du KCl 1.14%: l'activité spécifique des chloroplastes était de 2 à 3 fois supérieure à celle des microsomes (qui étaient d'ailleurs contaminés par des débris de chloroplastes), qu'il s'agisse de fragments nucléés ou de fragments anucléés\*. Le peu d'abondance des microsomes rend d'ailleurs incertaines les valeurs obtenues dans leur cas.

Les expériences faites au moyen de glycocolle- $\text{I}^{14}\text{C}$  sont beaucoup moins nombreuses et elles n'ont porté que sur des algues entières: elles ont montré que, pour des durées de 30 min à 5 h, il n'y a pas de différence significative de l'incorporation dans les protéines selon que les algues sont traitées par l'acide aminé marqué à la lumière ou à l'obscurité. L'incorporation dans les protéines est cependant inhibée de façon importante (44%) lorsque les algues sont maintenues pendant 2 semaines à l'obscurité avant de les traiter au glycocolle; on sait que, dans ces conditions, les nucléoles commencent à présenter les modifications caractéristiques qui ont été

\* Signalons que les expériences faites sur des homogénats ont montré que le liquide surnageant des fragments anucléés contient, en beaucoup plus grande abondance que celui des fragments nucléés, une substance visqueuse et incolore, qui provient sans doute des membranes.

décrivées par STICH<sup>11</sup>. Un autre moyen de réduire l'incorporation du glycocolle radioactif dans les protéines consiste à traiter les algues par du thiouracile  $10^{-3} M$  pendant quelques jours: l'inhibition ainsi obtenue est de l'ordre de 30%.

Le fait que l'incorporation diminue quand les algues sont traitées par un analogue de l'uracile et quand elles sont placées dans des conditions où le nucléole subit une diminution de la teneur en ARN laisse à penser que l'ARN intervient dans le métabolisme des protéines, lorsque le précurseur utilisé est un acide aminé tout au moins: cette impression se voit confirmée par le fait que l'incorporation du glycocolle est plus intense de 50 à 100% dans les microsomes (riches en ARN) que dans les chloroplastes, pour des expériences d'une durée de 1-5 h.

Il semble donc que les *Acetabularia* possèdent deux mécanismes distincts de synthèse protéique, selon que le  $\text{CO}_2$  ou la glycine servent de précurseur: ils diffèrent notamment par leur sensibilité à la lumière et par leur localisation intracellulaire. Cette conclusion cadre avec celles de BETH<sup>21</sup>, qui a montré que la croissance des tiges exige moins de lumière que la formation des chapeaux.

#### d. *Catalase et aldolase*

C'est à la suite d'une observation de BLINKS<sup>22</sup>, signalant que des algues marines réagissent à l'eau oxygénée produite par les radiations ionisantes en augmentant leur teneur en catalase, qu'il nous a paru utile de rechercher si une éventuelle synthèse adaptative de cet enzyme se trouve ou non sous le contrôle du noyau chez *Acetabularia*.

Les résultats de ces expériences ont été étrangement décevants: alors qu'en 1953, nous avons obtenu à de très nombreuses reprises une augmentation importante de l'activité catalasique dans les algues placées dans de l'eau de mer additionnée d'eau oxygénée ( $10^{-3} M$ ) pendant 2-3 jours, il nous a été impossible de reproduire le phénomène par la suite. Entre temps, la souche d'algue avait changé, ainsi que la terreau servant à préparer le milieu de culture. Nous ignorons si les échecs actuels tiennent à des raisons d'ordre génétique ou, ce qui semble plus probable, à la présence d'un facteur nécessaire à la synthèse adaptative de catalase, facteur qui se serait trouvé dans le milieu employé en 1953.

Dans ces conditions, il nous paraît inutile de donner de longs détails sur les résultats obtenus en 1953, puisqu'il plane sur eux un doute légitime: disons seulement que, dans ces expériences, l'activité catalasique augmentait de 2 à 5 fois après une adaptation de 2 à 4 jours. Dans les premiers jours qui suivaient la section, les deux types de fragments réagissaient de façon identique à l'addition d'eau oxygénée; mais après 2 semaines, c'est-à-dire au moment où la synthèse des protéines se ralentit sensiblement dans les fragments anucléés, ceux-ci voyaient leur capacité de s'adapter diminuer fortement.

Il est évident que l'intéressante question de savoir si le cytoplasme anucléé est capable ou non de réaliser la synthèse adaptative d'un enzyme reste ouverte et qu'elle devra être reprise en s'adressant à des enzymes moins fantaisistes dans leur comportement que la catalase.

Notre matériel s'est avéré tout aussi décevant dans le cas des enzymes dont on a affirmé qu'ils sont localisés exclusivement ou de façon prépondérante dans le noyau cellulaire: il s'agit notamment du ferment qui catalyse la synthèse du diphosphopyridinenucléotide à partir d'ATP et du nucléotide de la nicotinamide (HOGEBOOM ET SCHNEIDER<sup>23</sup>), de l'adénosinedésaminase, de la guanase et de la nucléoside-

phosphorylase (STERN *et al.*<sup>24</sup>). En effet, malgré l'emploi de méthodes très sensibles, nous n'avons pu déceler la présence d'aucun de ces enzymes dans les *Acetabularia*.

Des résultats plus encourageants viennent d'être obtenus, dans notre laboratoire, par E. BALTUS qui a entrepris l'étude d'un enzyme qui se trouverait accumulé dans les noyaux, chez les embryons de blé: c'est l'aldolase (STERN ET MIRSKY<sup>25</sup>). Les expériences montrent que l'enzyme est présent dans le cytoplasme anucléé et que, au cours des 10 jours qui suivent l'opération, il augmente, tout comme les protéines totales, de 40% environ. La synthèse de l'aldolase, chez *Acetabularia*, ne se trouve donc pas davantage placée sous un contrôle étroit du noyau que celle des autres protéines, tout au moins pendant la période où les fragments anucléés sont susceptibles d'une forte régénération.

### 3. Métabolisme de l'ARN

#### a. Evolution de l'ARN dans les fragments nucléés et anucléés

Ce n'est que récemment que la mise au point d'une méthode de dosage par dilution isotopique (*cf.* plus haut) nous a permis de suivre avec exactitude la teneur en ARN des fragments au cours de la régénération. Le Tableau X et la Fig. 11

TABLEAU X

Jours après la section		1	3	5	8	11	15	22	30
Expér. No. 1 $10^{-5} \mu M$ ARN pour 100 fragm.	Nucléés	—	12.8	19.0	22.5	26.7	29.1	29.0	45.2
	Anucléés	—	16.8	17.6	23.6	25.9	28.9	46.6	47.0
Expér. No. 2 $10^{-5} \mu M$ ARN pour 100 fragm.	Nucléés	12.2	11.8	23.5	27.3	23.2	23.8	32.0	35.3
	Anucléés	9.3	15.0	—	23.0	—	—	—	—

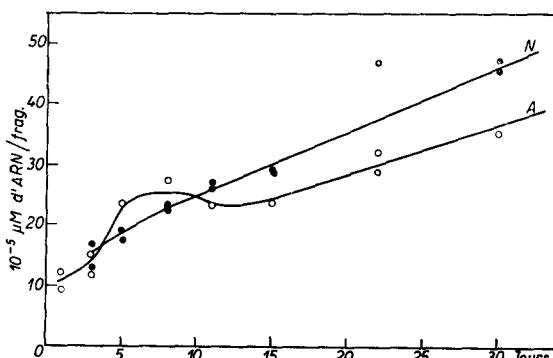


Fig. 11. Evolution de l'ARN dans les fragments N et A en fonction du temps écoulé depuis la section; conditions optimales de régénération. La continuation apparente de la synthèse dans les fragments A, après 15 j., est due à ce que seuls les fragments les plus vigoureux survivent à ce moment: une sélection s'opère donc.

résument les résultats de 2 expériences, effectuées en double, sur des fragments placés dans des conditions optimales de régénération.

Comme on peut le voir aisément, les résultats obtenus sont entièrement superposables à ceux qui ont été déjà décrits pour la teneur en protéines: contrairement à ce qu'on aurait pu supposer, les fragments anucléés sont, pendant une dizaine de jours, le siège d'une synthèse nette d'ARN; cette synthèse est même plus rapide que dans les moitiés nucléées, mais elle se ralentit fortement par la suite.

b. *Incorporation de l'acide orotique-2-<sup>14</sup>C dans l'ARN*

Cette incorporation est linéaire dans les algues entières pendant au moins une douzaine de jours et elle ne s'accompagne d'aucun changement dans le taux de la consommation d'oxygène; il ne semble donc pas que les *Acetabularia* soient capables d'utiliser de façon appréciable l'acide orotique comme substrat oxydatif. L'activité spécifique de l'acide orotique utilisé étant faible, les durées d'incubation ont dû être portées à 48 h; dans ces conditions, plus de 60% de la radioactivité se trouve dans le précipité trichloracétique délipidé, d'où elle peut être éliminée complètement par une extraction à l'acide trichloracétique (5%) à chaud. Vu la haute spécificité de l'acide orotique comme précurseur des pyrimidines de l'ARN (HURLBERT ET POTTER<sup>26</sup>) et le fait que l'incorporation se produit principalement dans la fraction qui contient cet acide, il est permis de penser que les mesures ci-dessous (Tableau XI) correspondent bien à l'incorporation du précurseur marqué dans l'ARN.

TABLEAU XI

INCORPORATION DE L'ACIDE OROTIQUE-2-<sup>14</sup>C DANS L'ARN. RAPPORT DES ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES

Nombre de jours après section	1	15	20	38	71
	N/A	1.34	1.20	1.43	1.48
					1.49

On voit que l'incorporation de l'acide orotique dans l'ARN, qui correspond sans doute surtout à son turnover, se maintient à un taux sensiblement constant en l'absence du noyau, même si la section date de plus de 2 mois. Le rapport N/A élevé, de l'ordre de 1.4, par rapport à celui observé pour la consommation d'oxygène et l'incorporation de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> dans les protéines (N/A voisin de 1.0) signifie sans doute que le turnover est particulièrement intense dans le noyau. Une telle conclusion cadre avec les résultats de STICH ET HÄMMERLING<sup>17</sup>, qui ont montré que l'incorporation du <sup>32</sup>P est extrêmement rapide dans l'ARN du nucléole. Le fait que, comme l'indique le Tableau X, les teneurs en ARN des deux types de fragments sont du même ordre de grandeur confirme cette interprétation; une autre constatation plaide dans le même sens: si on compare les incorporations de l'acide orotique dans les fragments anucléés et dans les tiges des fragments nucléés, isolées en coupant ces fragments après les avoir traités par le précurseur (tiges "nucléées"), on trouve des valeurs identiques. Par contre, l'incorporation dans l'ARN des rhizoïdes, qui contiennent le noyau, est environ 1.5 fois supérieure, bien que le rhizoïde contienne sensiblement moins d'ARN que la tige, comme le montre le Tableau XII.

TABLEAU XII

TENEUR EN ARN/POIDS SEC (%<sub>00</sub>) DES RHIZOÏDES, DES TIGES "NUCLÉÉES"  
ET DES TIGES ANUCLÉÉES À DIFFÉRENTS TEMPS APRÈS LA SECTION

Jours après la section	0	2	74	32
Rhizoïdes	0.26	0.37 ± 0.04	0.59	0.55 ± 0.02
Tiges "nucléées"	0.37 ± 0.13	0.49 ± 0.01	0.68 ± 0.1	0.66 ± 0.01
Tiges anucléées	0.67 ± 0.15	0.92 ± 0.06	0.78 ± 0.01	0.85 ± 0.07

Ces expériences montrent donc clairement que le métabolisme de l'ARN est identique dans les tiges, qu'elles soient nucléées ou non et que l'activité spécifique des rhizoides est nettement plus élevée, sans doute en raison de la présence du nucléole. Des observations autoradiographiques qui ont été faites sur l'incorporation de l'adénine dans les différentes régions dans *Acetabularia* et qui seront publiées ailleurs par l'une de nous (F.V.), démontrent, en effet, que ce précurseur de l'ARN est fixé avec une beaucoup plus grande rapidité dans le nucléole que dans les éléments cytoplasmiques.

#### IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Sans revenir sur chacun des points qui ont été soulevés dans le présent travail, nous nous bornerons à examiner deux questions principales: le rôle du noyau dans le métabolisme général de la cellule et son intervention dans le métabolisme des protéines et de l'ARN.

##### 1. Métabolisme général

Nos observations sur la consommation d'oxygène des *Acetabularia* conduisent à une conclusion qui prend une signification de plus en plus générale: c'est que *le noyau n'exerce pas de contrôle appréciable sur le taux des oxydations cellulaires*. Cette conclusion, qui est valable aussi pour l'amibe (BRACHET<sup>1</sup>), s'est avérée exacte dans le cas des oeufs d'oursin (SHAPIRO<sup>27</sup>) et des oocytes de grenouille (BRACHET<sup>28</sup>). On sait que les dosages exécutés sur des noyaux isolés montrent, de leur côté, qu'ils sont dépourvus d'enzymes oxydatifs (cf. STERN ET TIMONEN<sup>29</sup>, par exemple).

En fait, le cas d'*Acetabularia* semble montrer que le noyau, bien loin de contrôler le métabolisme respiratoire de la cellule, en est au contraire *dépendant* au double point de vue de sa morphologie et de sa composition chimique: les observations cytochimiques de STICH<sup>11</sup> sur les effets de l'obscurité chez *Acetabularia*, les nôtres sur les algues traitées par l'anaérobiose, le dinitrophénol ou l'acide usnique, plaident nettement dans ce sens. Une telle conclusion, qui place le noyau sous la dépendance des systèmes producteurs d'énergie cytoplasmiques, cadre d'ailleurs avec les idées exprimées récemment par STERN<sup>30</sup>.

Nous n'examinerons pas ici l'hypothèse, développée récemment par l'un de nous (BRACHET<sup>1</sup>), d'une production importante de co-enzymes nucléotidiques par le noyau: les données recueillies à ce sujet chez *Acetabularia*, sont trop fragmentaires pour qu'une discussion puisse être fructueuse. Tout au plus peut-on dire que la situation, chez *Acetabularia*, rappelle celle qui a été décrite chez l'amibe (BRACHET<sup>1</sup>): en particulier, la forte accumulation d'ATP qui a été observée dans les fragments anucléés cultivés pendant 3 semaines en présence d'adénine signifie sans doute que les liaisons phosphorées riches en énergie de l'ATP ne sont plus utilisés normalement au moment où les synthèses protéiques s'arrêtent.

##### 2. Métabolisme des protéines et de l'ARN

On ne peut manquer d'être impressionné par les faits de plus en plus nombreux à mesure que les documents sur le rôle biochimique du noyau s'accumulent, qui indiquent un parallélisme étroit entre le métabolisme des protéines et celui de l'ARN.

Une première constatation à faire, c'est que l'incorporation des précurseurs radioactifs les plus variés est plus rapide et plus intense dans l'ARN et dans les protéines

du noyau que dans les ribonucléoprotéides cytoplasmiques: le fait est connu depuis longtemps pour l'ARN du noyau (MARSHAK<sup>31</sup>, JEENER ET SZAFARZ<sup>32</sup>, BARNUM ET HUSEBY<sup>33</sup>, HURLBERT ET POTTER<sup>34</sup>, etc.), qui se marque beaucoup plus rapidement que celui des granules cytoplasmiques. C'est d'ailleurs cette constatation qui avait amené JEENER ET SZAFARZ<sup>32</sup> à supposer que l'ARN du noyau pourrait être le précurseur de celui du cytoplasme; cette hypothèse, qui a été critiquée depuis par BARNUM, HUSEBY ET VERMUND<sup>34</sup>, ne peut être entièrement exacte, puisque nos expériences établissent clairement que les fragments anucléés d'*Acetabularia* sont le siège d'une synthèse nette d'ARN.

Quant à l'incorporation des acides aminés marqués dans les protéines, les observations autoradiographiques récentes de FICQ ET ERRERA<sup>35</sup> indiquent une activité beaucoup plus élevée dans le noyau que dans le cytoplasme; selon FICQ<sup>36</sup>, ce serait le nucléole qui, conformément aux idées de CÄSPERSSON<sup>12</sup>, présenterait le métabolisme protéique le plus intense. Un léger doute planera cependant sur la validité de ces conclusions tant que les observations autoradiographiques n'auront pas été confirmées par des dosages effectués sur des noyaux isolés en milieu non aqueux.

Mais le fait que le métabolisme des protéines et de l'ARN est intense dans le nucléole n'implique pas nécessairement que les synthèses protéiques se trouvent placées sous un contrôle étroit du noyau: les observations présentes démontrent, au contraire, qu'une *synthèse simultanée d'ARN et de protéines peut se produire dans du cytoplasme pur, privé de noyau depuis plusieurs jours*. En réalité, au début de l'expérience, cette double synthèse est *plus rapide* dans le fragment anucléé que dans l'autre: il se pourrait que cette stimulation des synthèses ribonucléoprotéiques, après l'ablation du noyau, soit précisément due à ce que celui-ci, en raison de son métabolisme ribonucléoprotéique intense, réduise le cytoplasme à la portion congrue en utilisant pour son propre compte les précurseurs dont la cellule dispose. Une telle explication rendrait compte à la fois des observations biologiques de BETH<sup>20</sup>, qui a montré que le noyau inhibe la formation du chapeau chez *Acetabularia* et de celles de GIARDINA<sup>19</sup> sur la diminution rapide du rapport  $\frac{N \text{ protéique}}{N \text{ non protéique}}$  dans les fragments anucléés. On a vu plus haut que nous avons confirmé les résultats de GIARDINA<sup>19</sup>; mais l'interprétation que nous en donnons est, on le voit, différente.

De nombreuses observations récentes, effectuées sur des matériaux très divers, montrent nettement que l'incorporation des acides aminés dans les protéines et celle de précurseurs variés dans l'ARN se poursuivent pendant un certain temps en l'absence du noyau; celui-ci ne peut donc pas exercer un contrôle étroit sur les ribonucléoprotéides cytoplasmiques. Nous allons, pour terminer, passer en revue les cas les mieux connus.

Au sommet de l'échelle se place sans nul doute *Acetabularia*: comme on vient de le voir, non seulement l'incorporation du  $^{14}\text{CO}_2$  dans les protéines et celle de l'acide orotique dans l'ARN se maintiennent longuement en l'absence du noyau, mais il se produit même une synthèse nette de ribonucléoprotéides dans le cytoplasme anucléé. Les synthèses de l'ARN et des protéines sont, rappelons-le, exactement parallèles dans ce cas.

La situation n'est pas très différente pour les *réticulocytes*: les acides aminés s'incorporent dans leurs protéines (BORSOOK *et al.*<sup>37</sup>, KORITZ ET CHANTRENNE<sup>38</sup>, HOLLOWAY ET RIPLEY<sup>39</sup>, etc.) et la glycine dans leur ARN (KRUH ET BORSOOK<sup>40</sup>).

malgré la disparition du noyau. Il se produit même une synthèse d'hémoglobine (NIZET ET LAMBERT<sup>41</sup>) et d'enzymes (KORITZ ET CHANTRENNE<sup>38</sup>) dans ces cellules anucléées. Par la suite, la teneur en ARN baisse et le métabolisme protéique diminue de façon parallèle: les observations autoradiographiques de GAVOSTO ET RECHENMANN<sup>42</sup> démontrent, de façon frappante, qu'il existe une corrélation étroite entre la chute de la basophilie et la diminution de l'incorporation de la glycine dans les protéines, au cours de la maturation des réticulocytes.

Dans les *oeufs* d'oursin coupés en deux par ultracentrifugation (MALKIN<sup>43</sup>) et dans les *oeufs* de triton ligaturés étudiés par TIEDEMANN ET TIEDEMANN<sup>44</sup>, le fragment anucléé ne le cède en rien à son congénère nucléé en ce qui concerne l'incorporation de précurseurs radioactifs dans l'ARN et les protéines; chez l'oursin notamment, l'incorporation de la glycine radioactive est notablement plus élevée dans l'ARN des fragments anucléés que dans les moitiés nucléées; la différence est toutefois moindre dans le cas des protéines (MALKIN<sup>43</sup>). Il est vraisemblable que, dans ces *oeufs* vierges où les synthèses protéiques semblent négligeables, les phénomènes observés correspondent essentiellement au maintien du turnover normal dans le cytoplasme anucléé.

Enfin, c'est l'amibe que nous trouvons tout au bas de l'échelle, puisque, MAZIA ET PRESCOTT<sup>45</sup> viennent de montrer que l'ablation du noyau provoque, en 2-3 h déjà, une diminution massive de l'incorporation de la méthionine radioactive dans les protéines: le rapport N/A atteint déjà 6 après quelques heures, et il arrive à 20 au bout de 2-3 jours. MAZIA ET PRESCOTT<sup>45</sup> en concluent que si le noyau est un lieu important de synthèses protéiques, celles-ci continuent cependant dans le cytoplasme anucléé. Notre collaboratrice A. FICQ effectue, en ce moment, une vérification des observations de MAZIA ET PRESCOTT<sup>45</sup> en utilisant un autre précurseur, la phénylalanine radioactive, et une technique autoradiographique; ses résultats, tout en confirmant les conclusions de MAZIA ET PRESCOTT<sup>45</sup>, indiquent cependant que le phénomène ne serait pas aussi massif que ne le pensent les auteurs américains: les rapports N/A observés sont, en effet, de 3 pour des fragments de 30 h à 5 jours et de 8.6 pour les fragments de 9 jours. La différence de comportement qui se manifeste entre l'amibe et l'*Acetabularia* ne doit pas surprendre, si on admet l'existence d'un lien entre l'ARN et l'anabolisme protéique: en effet, alors que le fragment anucléé d'*Acetabularia* est capable d'une synthèse nette d'ARN, l'amibe sans noyau voit sa teneur en ARN baisser massivement et rapidement (BRACHET<sup>1</sup>; JAMES<sup>46</sup>). N'oublions pas non plus que les conditions expérimentales sont extrêmement différentes chez l'amibe de ce qu'elles sont dans les *Acetabularia*: alors que les fragments anucléés d'amibes sont dans l'impossibilité de se nourrir et, par conséquent, de recevoir les matériaux nécessaires à leur synthèse de protéines, la tige anucléée d'*Acetabularia*, comme on l'a vu, conserve intégralement son activité photosynthétique.

Nous croyons, en conclusion, que le métabolisme protéique et ribonucléique est particulièrement intense dans le noyau, surtout dans le nucléole; néanmoins, ce métabolisme se maintient longuement intact au sein du cytoplasme anucléé, qui peut même être le siège d'une synthèse nette d'ARN et de protéines. Dans tous les cas étudiés jusqu'à présent, l'anabolisme protéique et celui de l'ARN évoluent de façons rigoureusement parallèles dans le cytoplasme qui a été privé de son noyau; ce parallélisme étroit apporte un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse, émise simultanément par CASPERSSON<sup>12</sup> et par l'un de nous (BRACHET<sup>13</sup>) d'une intervention de l'ARN dans la synthèse des protéines.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier très vivement tous ceux qui ont participé avec nous à la partie expérimentale du travail, en particulier D. SZAFARZ, J. BRYGIER, M. CHANTRENNE-VAN HALTEREN et E. DE SAEDELEER.

## RÉSUMÉ

1. L'ablation du noyau ne modifie pas la consommation d'oxygène de l'algue *Acetabularia* et elle n'exerce que peu d'effets sur la pénétration du  $^{32}\text{P}$ .
2. La morphologie du noyau et sa composition chimique sont modifiées profondément par l'inhibition des phosphorylations oxydatives.
3. Une synthèse nette de protéines et d'ARN est possible dans les fragments anucléés; elle peut même être initialement plus rapide dans ces fragments que dans les moitiés nucléées, mais elle se ralentit ensuite.
4. L'incorporation de précurseurs radioactifs dans les protéines et l'ARN se poursuit pendant plusieurs mois à un taux normal en l'absence du noyau.
5. La signification de ces résultats est discutée.

## SUMMARY

1. Removal of the nucleus has no effects on the oxygen consumption of the alga *Acetabularia* and little effect on the uptake of  $^{32}\text{P}$ .
2. The morphology and the chemical composition of the nucleus undergo strong modifications when oxidative phosphorylations are inhibited.
3. A clear protein and RNA synthesis is possible in non-nucleated pieces; this synthesis can even proceed at a faster rate in the non-nucleated halves than in the other, but it slows down later on.
4. Incorporation of labelled precursors into proteins and RNA occurs, at a normal rate, during several months in non-nucleated cytoplasm.
5. The meaning of these results is discussed.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Entfernung des Zellkernes hat keinen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch der Alge *Acetabularia* und wenig Einfluss auf den  $^{32}\text{P}$ -Verbrauch.
2. Die Morphologie und die chemische Komposition des Zellkernes weisen starke Veränderungen auf, wenn oxydative Phosphorylierungen gehemmt sind.
3. Eine klar ersichtliche Protein- und RNA-Synthese ist in den entkernten Teilen möglich; diese Synthese kann sogar schneller in den entkernten Teilen vorangehen, als in dem anderen, sinkt jedoch später herab.
4. Während mehrerer Monate findet die Einverleibung markierter Vorgänger in Proteinen und RNA im entkernten Zytoplasma mit normaler Geschwindigkeit statt.
5. Die Bedeutung dieser Ergebnisse wird erörtert.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. BRACHET, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 247.
- <sup>2</sup> D. MAZIA ET H. HIRSHFIELD, *Science*, 112 (1950) 297.
- <sup>3</sup> J. HÄMMERLING, *Arch. entw. Mech.*, 131 (1934) 1.
- <sup>4</sup> J. HÄMMERLING, *Intern. Rev. Cytol.*, 2 (1953) 475.
- <sup>5</sup> F. VANDERHAEGHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 281.
- <sup>6</sup> J. BRACHET, *Quart. J. Microsc. Sci.*, 94 (1953) 1.
- <sup>7</sup> R. D. HOTCHKISS, *Arch. Biochem.*, 16 (1948) 131.
- <sup>8</sup> R. MARKHAM, *Biochem. J.*, 36 (1942) 790.
- <sup>9</sup> S. MOORE ET H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- <sup>10</sup> H. CHANTRENNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 410.
- <sup>11</sup> H. STICH, *Z. Naturforsch.*, 6b (1951) 319.
- <sup>12</sup> T. CASPERSSON, *Naturwiss.*, 29 (1941) 33.

- <sup>13</sup> J. BRACHET, *Arch. Biol.*, 53 (1941) 207.
- <sup>14</sup> A. BRACHET, *Arch. Biol.*, 32 (1922) 205.
- <sup>15</sup> H. STICH, *Naturwiss.*, 18 (1951) 435.
- <sup>16</sup> J. HÄMMERLING ET H. STICH, *Z. Naturforsch.*, 9b (1954) 149.
- <sup>17</sup> H. STICH ET J. HÄMMERLING, *Z. Naturforsch.*, 9b (1953) 329.
- <sup>18</sup> H. STICH, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 36.
- <sup>19</sup> G. GIARDINA, *Experientia*, 10 (1954) 215.
- <sup>20</sup> K. BETH, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 771.
- <sup>21</sup> K. BETH, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 334.
- <sup>22</sup> L. R. BLINKS, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 39, suppl. 2 (1952) 11.
- <sup>23</sup> G. H. HOGEBOOM ET W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 197 (1952) 611.
- <sup>24</sup> H. STERN, V. ALLFREY, A. E. MIRSKY ET H. SAETREN, *J. Gen. Physiol.*, 35 (1952) 559.
- <sup>25</sup> H. STERN ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1952) 181.
- <sup>26</sup> R. B. HURLBERT ET V. R. PÖTTER, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 257.
- <sup>27</sup> H. SHAPIRO, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 6 (1935) 101.
- <sup>28</sup> J. BRACHET, *Biol. Bull.*, 74 (1938) 93.
- <sup>29</sup> H. STERN ET S. TIMONEN, *J. Gen. Physiol.*, 38 (1954) 41.
- <sup>30</sup> H. STERN, *Science*, 121 (1955) 144.
- <sup>31</sup> A. MARSHAK, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 32 (1948) 381.
- <sup>32</sup> R. JEENER ET D. SZAFARZ, *Arch. Biochem.*, 26 (1950) 54.
- <sup>33</sup> C. P. BARNUM ET R. A. HUSEBY, *Arch. Biochem.*, 29 (1950) 7.
- <sup>34</sup> C. P. BARNUM, R. A. HUSEBY ET H. VERMUND, *Cancer Research*, 13 (1953) 880.
- <sup>35</sup> A. FICQ ET M. ERRERA, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 45.
- <sup>36</sup> A. FICQ, *Experientia*, 9 (1953) 377.
- <sup>37</sup> H. BORSOOK, C. L. DEASY, A. J. HAAGEN-SMIT, O. KEIGHLEY ET P. H. LOWY, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 669.
- <sup>38</sup> S. B. KORITZ ET H. CHANTRENNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 209.
- <sup>39</sup> B. W. HOLLOWAY ET S. H. RIPLEY, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 695.
- <sup>40</sup> J. KRUH ET H. BORSOOK, *Nature*, 175 (1955) 386.
- <sup>41</sup> A. NIZET ET S. LAMBERT, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 771.
- <sup>42</sup> F. GAVOSTO ET R. RECHENMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 583.
- <sup>43</sup> H. M. MALKIN, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 44 (1954) 105.
- <sup>44</sup> H. TIEDEMANN ET H. TIEDEMANN, *Naturwiss.*, 41 (1954) 535.
- <sup>45</sup> D. MAZIA ET D. M. PRESCOTT, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 23.
- <sup>46</sup> T. W. JAMES, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 367.

Reçu le 20 juin 1955