

LA CONTINUITÉ GÉNÉTIQUE DES CHLOROPLASTES CHEZ LES EUGLÈNES

I. MÉCANISME DE L'APPARITION DES LIGNÉES BLANCHES DANS LES CULTURES TRAITÉES PAR LA STREPTOMYCINE

M. DE DEKEN-GRENSON ET S. MESSIN

Laboratoire de Physiologie animale, Université de Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

Les nombreux travaux qui concernent le déterminisme des caractères des chloroplastes ont conduit à la certitude que, si de nombreux gènes nucléaires contrôlent la synthèse des constituants chloroplastiques, celle-ci est néanmoins influencée, à la fois, par la "constitution cytoplasmique" dans son ensemble et par les chloroplastes eux-mêmes.

Le chloroplaste apparaît comme un élément indispensable à sa propre perpétuation au sein d'une lignée cellulaire (LWOFF¹), de même qu'il exerce une influence certaine sur l'orientation des synthèses qui assurent sa croissance et sa reproduction. C'est là un exemple typique de "particule douée de continuité génétique".

Les faits connus jusqu'à présent n'imposent en aucune manière que les chloroplastes contiennent l'équivalent de gènes nucléaires, mais ils ne l'excluent pas davantage. Quelle est donc la nature de l'auto-dépendance des chloroplastes? La complexité du problème exige qu'on l'aborde indirectement et par plusieurs voies. L'étude des effets de la streptomycine (Sm) semblait pouvoir représenter l'une de ces voies d'approche.

On sait que la streptomycine (dont le mode d'action est malheureusement encore inconnu) empêche la formation des chloroplastes chez les plantes supérieures (VON EULER²; BRACCO ET VON EULER³). Les Euglènes cultivées en présence de streptomycine perdent définitivement leurs chloroplastes (PROVASOLI, HUTNER ET SCHATZ⁴): le patrimoine héréditaire de l'ensemble des individus de la culture a été modifié. On pouvait, dès lors, se demander si la modification héréditaire qui se manifeste chez ces Flagellates verts a son siège au niveau du noyau, des chloroplastes ou du cytoplasme.

L'idée d'une mutation nucléaire en masse paraissait insolite dès l'abord. D'autre part, un travail précédent (DE DEKEN-GRENSON⁵) avait conduit à l'idée que, dans les plantules d'orge, l'action de la streptomycine se limite à une inhibition de la croissance et de la différenciation des proplastides en chloroplastes, sans effet sur des facteurs de l'hérédité, quels qu'ils soient. On pouvait donc s'attendre à ce que la streptomycine n'induisît pas davantage chez les Euglènes que chez les plantes supérieures la mutation d'un gène nucléaire ou la modification définitive de constituants chloroplastiques à propriétés de gènes.

Les hypothèses les plus plausibles concernant la nature de l'altération du patrimoine héréditaire sont donc soit la perte des chloroplastes (indispensables à leur propre reproduction) résultant d'un simple abaissement de leur vitesse différentielle de croissance par rapport à la croissance cellulaire, soit une altération irréversible du cytoplasme, empêchant toute reproduction ultérieure des chloroplastes.

Ces diverses possibilités (mutation de gènes ou d'éléments chloroplastiques à propriétés de gènes, perte des chloroplastes, et apparition de conditions cytoplasmiques défavorables) ont été départagées expérimentalement sur la base suivante.

Si la modification du patrimoine héréditaire était due uniquement à la perte des chloroplastes, la synthèse de ceux-ci devrait pouvoir reprendre, une fois la streptomycine éliminée, dans celles des cellules qui ont hérité d'un chloroplaste et jamais dans celles qui n'en ont pas reçu. Dans tous les autres cas, il n'y a aucune raison d'observer une relation entre la présence d'un chloroplaste dans une cellule et la possibilité pour celle-ci de synthétiser des particules.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé pour cette étude une souche d'*Euglena gracilis*, variété *bacillaris*, originaire de Mayence, et que nous devons à l'amabilité de monsieur H. C. HEINRICH.

Le sulfate de streptomycine a été obligeamment mis à notre disposition par la firme Pfizer, à laquelle nous adressons nos plus vifs remerciements.

Les concentrations de streptomycine sont exprimées en grammes de base libre pour 100 ml de solution.

Les organismes ont été cultivés dans le milieu de HUTNER *et al.*⁶, dont le pH a été ajusté à une valeur de 7.0 à l'aide de NaOH. Les cultures sont maintenues sous éclairage constant réalisé par des tubes à fluorescence, dans une étuve à circulation d'air maintenue à une température de $23^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$. Dans ces conditions, les Euglènes se multiplient au rythme d'une division toutes les 24 heures.

La croissance a été suivie par des mesures d'opacité réalisées à l'aide du spectrophotomètre Coleman, modèle 14, à la longueur d'onde de 700 m μ (à laquelle l'interférence avec l'absorption de la lumière par les pigments chlorophylliens est négligeable), dans des tubes de 18 mm d'épaisseur, et dans conditions où l'opacité mesurée est une fonction linéaire de la concentration cellulaire.

La teneur des cellules en pigments chlorophylliens a été évaluée de la manière suivante: un volume adéquat de la culture d'Euglènes est centrifugé à 3,000 tours/minute, pendant 5 minutes. Le culot de cellules est remis en suspension dans de l'eau distillée et centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot est alors dispersé dans 3 ml de méthanol absolu. Après centrifugation à l'abri de la lumière, l'absorption de la lumière à 665 m μ par le liquide surnageant est déterminée à l'aide du spectrophotomètre Beckman, modèle DU. Les quantités de chlorophylle sont exprimées en unités arbitraires (densité optique lue dans les conditions décrites ci-dessus, et rapportée à 10 ml de culture). La mesure de la teneur moyenne des cellules en chloroplastes est fournie par la valeur ci-dessus, divisée par l'opacité de la culture.

Culture de colonies isolées sur milieu gélosé (milieu de culture mentionné plus haut, additionné de 1.5 % d'agar-agar). Les organismes étant extrêmement mobiles et les cultures devant être suivies pendant plusieurs semaines, si les étalements des cellules sont faits en surface du milieu gélosé, les colonies se dispersent et se mélangent, rendant tout examen quantitatif impossible. Afin de tourner cette difficulté, les Euglènes ont été cultivées en profondeur du milieu gélosé. Le milieu solide est réparti dans des tubes par fractions de 20 ml. Après stérilisation, les tubes sont portés dans un bain thermostatique à 45° ; 0.1 ml d'une suspension d'Euglènes très diluée est additionné à chaque tube dont le contenu est immédiatement versé dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre. Les organismes supportent la température de 45° pendant une fraction de minute sans montrer de modification décelable. Les proportions des colonies blanches et vertes ont été déterminées sur 300 colonies au minimum, dans chaque cas.

Des observations microscopiques (voir plus loin) ont permis d'établir un parallélisme suffisant entre la teneur des Euglènes en chlorophylle et le nombre de chloroplastes qu'elles renferment pour que l'on puisse utiliser les estimations de la teneur en chlorophylle des cellules comme une mesure du nombre de chloroplastes.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. Notre premier objectif était d'examiner d'une manière globale, sur l'ensemble d'une culture, si l'effet de la Sm est, par nature, irréversible ou non. Dans ce but, une culture d'Euglènes vertes, en phase exponentielle de croissance, est centrifugée et les cellules sont remises en suspension dans du milieu de culture contenant du sulfate de Sm à raison de 0.2 g de base libre pour 100 ml. Après une demi-heure, la culture est à nouveau centrifugée, les cellules sont lavées à l'aide de milieu normal et remises en suspension dans du milieu exempt de Sm. On suit alors la croissance cellulaire par des mesures d'opacité et la teneur des cellules en chlorophylles, comme il a été dit plus haut. Dès qu'une culture approche de la fin de la période exponentielle de croissance, une aliquote est repiquée dans un milieu frais. Il arrive que le repiquage provoque des perturbations plus ou moins importantes dans la teneur des cellules en chlorophylles. C'est la raison pour laquelle nous avons indiqué les repiquages sur les graphiques.

La Fig. 1 montre les résultats d'une telle expérience, tandis que la Fig. 2 illustre le comportement d'une culture témoin (non traitée par la Sm). Dans la culture témoin, les variations de la teneur des cellules en chlorophylles sont négligeables: la courbe de la synthèse des chlorophylles en fonction du temps est pratiquement parallèle à la courbe de croissance des organismes. Au contraire, le traitement par la Sm provoque un arrêt de la synthèse des chlorophylles. Remarquons que le milieu contenant de la Sm ne reste en contact avec les cellules que pendant une demi-heure,

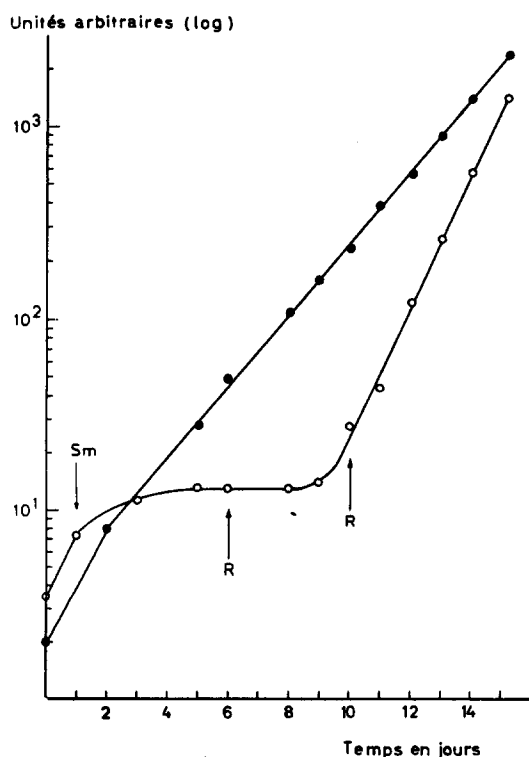


Fig. 1.

Fig. 1. Courbes de croissance cellulaire (●—●) et de synthèse des chlorophylles (○—○) d'une culture d'Euglènes traitée par la Sm à 0.2 %, pendant 1/2 heure, au moment indiqué par la flèche ↓. R = repiquages de la culture (voir texte).

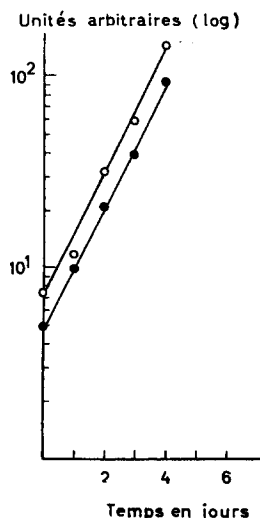


Fig. 2.

Fig. 2. Courbes de croissance cellulaire (●—●) et de synthèse des chlorophylles (○—○) d'une culture d'Euglènes témoin.

soit environ 2% du temps de génération. Cependant, son effet se manifeste pendant une bien plus longue période, vraisemblablement parce que l'antibiotique est concentré à l'intérieur des cellules par un mécanisme d'accumulation active et n'en ressort que très lentement, comme c'est le cas pour l'algue *Nitella* (PRAMER^{7,8}). Durant les 24 à 48 heures qui suivent le traitement par la Sm (soit 1 ou 2 générations), le taux de synthèse des chlorophylles s'abaisse progressivement. D'une manière générale (il a été réalisé, à des fins diverses, une vingtaine d'expériences de ce type), dans le milieu de culture utilisé pour ce travail, toute synthèse de chlorophylle a cessé après deux générations, tandis que les cellules continuent à se diviser à une vitesse à peine réduite. Pendant une durée qui varie d'une expérience à l'autre (1 à 10 générations et même davantage), la quantité totale de chlorophylle de la culture reste constante ou peut même décroître, bien que la population s'accroisse sans cesse.

Quantité moyenne de chlorophylle
par cellule en
unités arbitraires

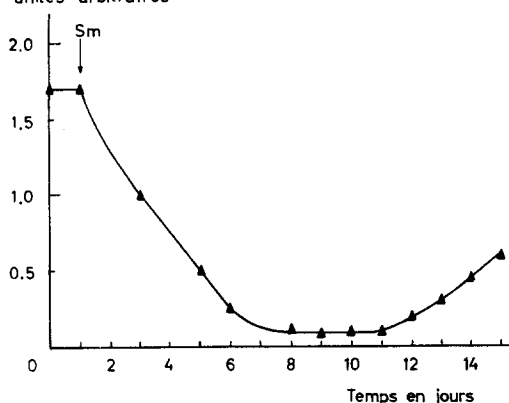


Fig. 3. Evolution de la teneur moyenne des cellules en chlorophylle au cours de l'expérience rapportée sur la Fig. 1.

Enfin, une fois cette période écoulée, la synthèse des chlorophylles reprend, à un taux généralement plus élevé que dans les conditions normales. La Fig. 3 illustre l'évolution de la teneur des Euglènes en chlorophylles au cours de l'expérience rapportée sur la Fig. 1.

Si la dose de Sm appliquée est plus élevée (concentration plus forte de Sm ou durée d'application plus longue), la période d'arrêt de la synthèse des chlorophylles se prolonge. Une augmentation de la dose de Sm appliquée (les essais n'ont pas dépassé la dose de 2 g/100 ml, pendant 24 heures) ne permet pas d'obtenir un arrêt immédiat de la synthèse des chlorophylles. La lenteur de la pénétration de l'antibiotique à l'intérieur des cellules ne pourrait expliquer ce retard, puisque tout ceci se présente alors que la Sm a été retirée du milieu de culture depuis plus de 20 heures.

Lorsque la dose de Sm appliquée est plus faible, le blocage de la synthèse des chlorophylles est partiel et le retour à l'état normal est plus rapide.

Si la Sm (0.2 g/100 ml) est laissée au contact des cellules d'une manière permanente, la synthèse des chlorophylles ne reprend pas, tandis que les organismes continuent à se multiplier pendant de nombreuses générations (plusieurs cultures ont été suivies pendant une vingtaine de générations en présence de Sm). Nous n'avons jamais observé de lignées résistantes à l'effet de la Sm sur les chloroplastes.

A partir de 2 ou 3 générations de ce traitement, on peut d'ailleurs repiquer les cellules dans le milieu utilisé pour ces expériences et dépourvu de Sm sans voir réapparaître aucune cellule verte (souches suivies pendant plusieurs centaines de générations).

Le nombre de chloroplastes par cellule dans les cultures traitées par la Sm à 0.2% pendant une demi-heure a été suivi par l'observation microscopique des cellules vivantes. Les résultats d'une telle expérience sont rapportés sur les Figs. 4 et 5.

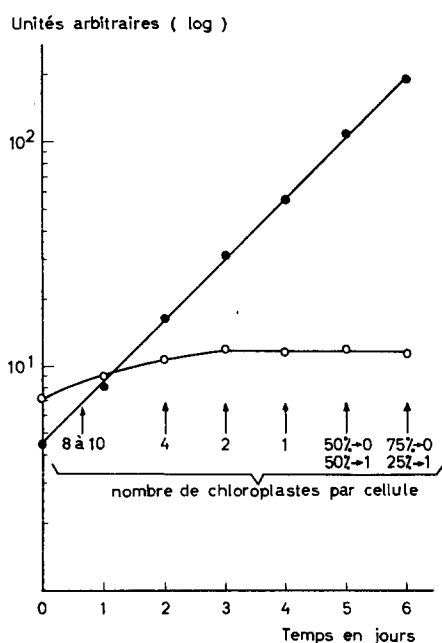


Fig. 4.

Fig. 4. Evolution du nombre de chloroplastes par cellule après un traitement par la Sm à 0.2%, pendant 1/2 heure, au temps 0. ●—● Croissance cellulaire; ○—○ Synthèse de chlorophylle.

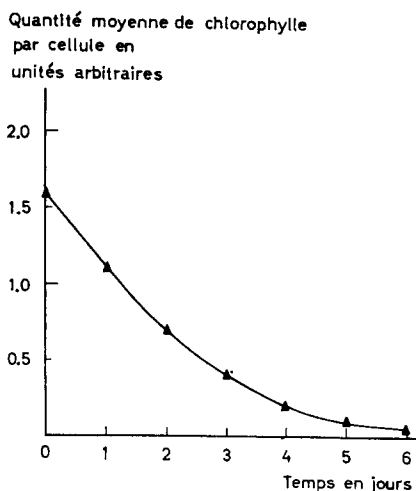


Fig. 5.

Fig. 5. Evolution de la teneur moyenne des Euglènes en chlorophylle au cours de l'expérience rapportée sur la Fig. 4.

Les mesures d'opacité, les dosages des chlorophylles et les comptages des chloroplastes ont été faits toutes les 24 heures, ce qui correspond à une génération. Le nombre des chloroplastes a été déterminé en examinant chaque jour 400 à 500 cellules. Le comptage des chloroplastes est extrêmement malaisé dans les Euglènes normales, du fait des grandes dimensions des chloroplastes et de l'abondance des grains de paramylon très réfringents: nous n'en tiendrons pas compte. Il devient plus facile lorsque le nombre de chloroplastes par cellule baisse. Les Euglènes à 4 plastas semblent prédominer 48 heures après le traitement par la Sm. A la génération suivante (3ème génération), on peut reconnaître aisément que 80% environ des organismes de la culture possèdent 2 chloroplastes; les autres cellules en ont 4, 3 ou 1. A la 4ème génération, environ 80% des cellules ont un seul chloroplaste; les autres en ont 2 ou 0; très rares sont celles qui en ont plus de 2; aucune n'est restée normale. Dans l'expérience que nous rapportons ici, la teneur des cellules en chloroplastes était, à ce moment (4ème génération), de 1/8 de celle des cellules normales. Dans toutes les expériences réalisées, cette valeur s'est localisée entre 1/8 et 1/10. C'est à la 5ème génération qu'apparaissent les premières Euglènes dépourvues de chloroplaste, à raison de 45 à 50% de la population, tandis que des cellules à 1 chloroplaste constituent également 45 à 50% de la population. A ce moment, la teneur des cellules en

chlorophylles représente 1/15 à 1/20 de celle de la souche avant le traitement par la Sm.

Ces résultats nous paraissent justifier deux conclusions: (1) que l'estimation de la teneur des Euglènes en chlorophylles fournit une mesure satisfaisante du nombre de chloroplastes par cellule dans les Euglènes normales ou traitées par la Sm; (2) que les Euglènes vertes normales de la souche étudiée contiennent, en moyenne, 8 à 10 chloroplastes.

Lorsque le blocage de la synthèse des chlorophylles est partiel, le taux de diminution du nombre de chloroplastes par cellule est évidemment abaissé.

Notons que la Sm ne détruit pas les chloroplastes: elle empêche simplement leur croissance et leur multiplication. Le paramylon continue d'être synthétisé et de s'accumuler sous la forme de grains très réfringents, même dans les Euglènes blanches.

Au moment où les dosages indiquent que la synthèse des chlorophylles a repris et que les chloroplastes se sont remis à se multiplier, on ne voit pas immédiatement réapparaître des organismes contenant plus d'un chloroplaste. C'est le nombre de cellules à un plaste qui augmente au cours d'une première période, qui correspond à une phase où la synthèse des chloroplastes a repris, mais à un taux qui ne dépasse pas celui des divisions cellulaires. On pourrait s'attendre à voir se perpétuer, dès lors, des lignées d'Euglènes possédant un unique chloroplaste. Cependant, il n'en est rien et cette période, qui peut être plus ou moins longue, est toujours transitoire. Après une ou plusieurs générations caractérisées par ce régime, apparaissent des cellules possédant plus d'un chloroplaste, tandis que le taux de croissance des chlorophylles dépasse celui de la croissance cellulaire (voir Fig. 1). Au bout de quelques générations, on ne peut plus déceler de cellules à nombre réduit de chloroplastes; il ne subsiste plus que deux types de cellules: les unes sont vertes et contiennent en moyenne 8 à 10 chloroplastes; elles ne présentent aucune différence décelable avec des Euglènes normales qui n'ont pas subi l'action de la Sm; les autres sont blanches, dépourvues de chloroplastes d'une manière héréditaire.

Dans les conditions expérimentales que nous avons adoptées, l'action de la Sm n'est donc pas irréversible pour toutes les cellules et nous n'avons certainement pas affaire à une mutation en masse.

II. *Vérification de ces données au niveau cellulaire*

Il paraissait raisonnable de penser que, des deux types stables de cellules trouvées en mélange dans les cultures traitées par une faible dose de Sm, les Euglènes vertes normales provenaient des cellules qui, par hasard, avaient hérité d'un chloroplaste, au cours de la répartition du nombre limité de ces organites entre des cellules plus nombreuses que ceux-ci, alors que les cellules héréditairement blanches devaient être issues de celles des Euglènes qui n'avaient pas emporté de chloroplaste au cours de cette distribution.

La vérification directe de cette hypothèse, en suivant, à l'aide du microscope, le sort de cellules isolées, présente des difficultés techniques dues notamment au fait que l'observation des chloroplastes exige l'utilisation d'un très fort grossissement. Elle est actuellement en cours et les résultats seront publiés ultérieurement.

Nous ne présenterons ici que les données obtenues sur une base statistique. Le principe des expériences est le suivant. Une culture d'Euglènes est traitée par la Sm pendant une durée brève et maintenue ensuite dans un milieu liquide normal.

Supposons un cas idéal où la dose de Sm appliquée bloquerait la synthèse des chloroplastes d'une manière immédiate et complète; la répartition des chloroplastes se ferait suivant le schéma de la Fig. 6. Si, toutes les 24 heures environ, c'est-à-dire une fois par génération, des aliquotes de cette culture liquide sont dispersées dans la profondeur d'un milieu de culture gélosé (technique décrite plus haut), les prélèvements successifs contiendraient des Euglènes renfermant un nombre décroissant de chloroplastes par cellule. Dans les prélèvements 0, 1, 2 et 3 (voir Fig. 6), toutes les cellules étalées contiennent au moins un chloroplaste. A la génération suivante (prélèvement 4), 50% environ des cellules étalées ont un chloroplaste, tandis que les autres n'en ont plus. En (5), il n'y a plus que 25% de cellules à un plaste, en (6), 12.5% etc...

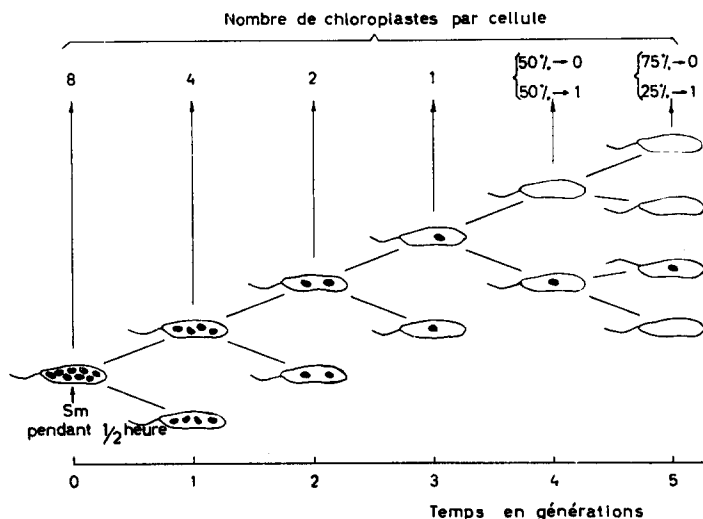


Fig. 6. Répartition des chloroplastes entre les cellules filles, après un traitement des Euglènes par la Sm à 0.2% pendant 1/2 heure, au temps 0.

Il faut donc s'attendre, si notre hypothèse correspond à la réalité, à ce que, au moment où chaque cellule aura donné une colonie dont la couleur puisse être décelée (2 à 3 semaines; à ce moment, les cellules capables de former des chloroplastes ont retrouvé depuis longtemps leur teneur normale en chlorophylles), toutes les cellules aient donné naissance à des colonies vertes en 0, 1, 2, et 3, tandis qu'en 4, 50% des cellules donnent des colonies vertes et 50%, des colonies blanches, qu'on trouve 25% de colonies vertes en 5, 12.5% en 6 etc...*

Il va de soi que l'arrêt de la multiplication des chloroplastes n'étant pas immédiat, mais progressif, la réduction du nombre de chloroplastes par cellule est plus lente que dans le schéma décrit ci-dessus. Dans les conditions expérimentales adoptées pour la plupart des expériences (Sm 0.2% appliquée pendant une demi-heure), il faut généralement 2 générations environ (à partir du traitement par l'antibiotique) pour obtenir des cellules contenant 4 chloroplastes. A la génération suivante, on retrouve le rythme de répartition type décrit plus haut.

La Fig. 7 montre les résultats d'une telle expérience, confrontés avec les valeurs théoriques envisagées ci-dessus. Une culture d'Euglènes a été partagée en 4 lots

* Les "colonies vertes" sont évidemment constituées d'un mélange de cellules vertes et de cellules blanches.

équivalents qui ont été traités par 4 doses différentes de Sm: 0.04% pendant 1/2 heure et 2 heures, et 0.2% pendant les mêmes temps. On y remarquera tout d'abord que le pourcentage des colonies vertes dénombrées dans les prélèvements successifs réalisés à partir d'une culture liquide diminue progressivement, ainsi que le prévoyait l'hypothèse de départ. Cependant, les pourcentages de lignées vertes trouvés expérimentalement sont, dans tous les cas, largement inférieurs aux valeurs prévues, ce qui signifie que certaines des cellules contenant au moins un chloroplaste ne donnent pas naissance à une lignée verte. De plus, les valeurs trouvées dépendent de la dose de Sm appliquée: plus la dose augmente, plus grand est le nombre de cellules possédant un chloroplaste qui donnent naissance à une lignée blanche.

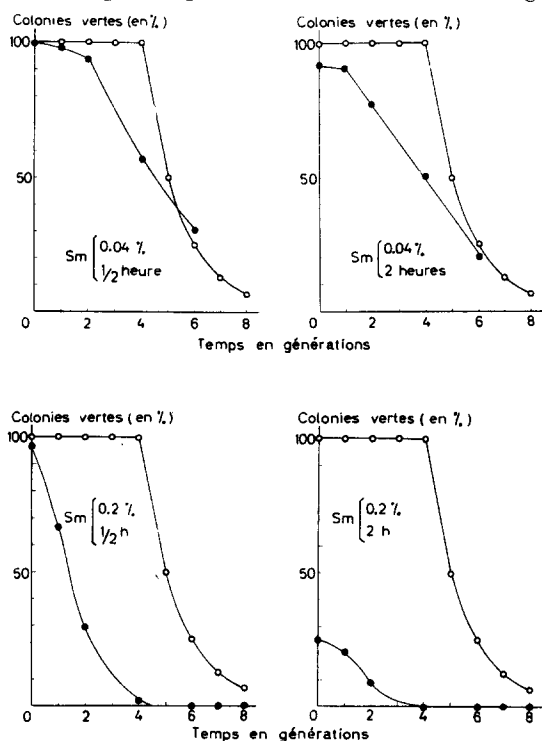


Fig. 7. Pourcentage de colonies vertes nées d'Euglènes traitées par la Sm au temps 0, cultivées ensuite sur milieu liquide normal, et étalées sur milieu solide aux moments indiqués en abscisse.

○—○ courbes théoriques; ●—● courbes expérimentales.

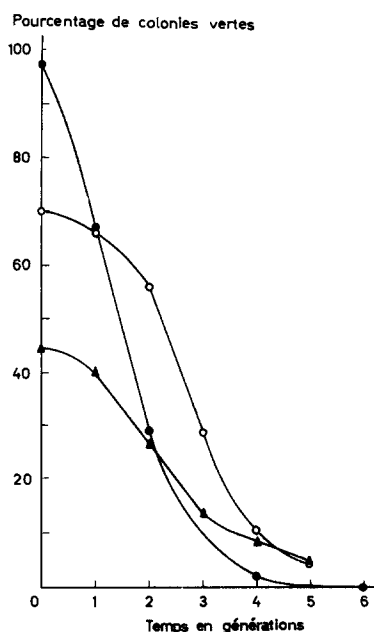


Fig. 8. Traitement de 3 cultures indépendantes par la Sm à 0.2%, pendant 1/2 heure, au temps 0. Explications dans le texte.

D'autre part, une même dose de Sm peut produire des effets quantitativement fort divers d'une expérience à l'autre. Les différences semblent provenir de l'état physiologique de la culture (cependant toujours traitée alors qu'elle se trouve en phase exponentielle de croissance). Un facteur important de variabilité réside dans l'importance de l'inoculum au moment du transfert des organismes dans un milieu normal, après le traitement par la Sm. La Fig. 8 montre les résultats du traitement de 3 cultures indépendantes par la Sm à 0.2%, pendant une demi-heure*.

* Le facteur principal responsable de cette variabilité a été actuellement identifié: il s'agit de la concentration du milieu de culture en fer assimilable, concentration qui dépend de l'âge du milieu. Ce phénomène, ainsi que le rôle de l'importance de l'inoculum seront analysés ultérieurement.

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSION

Deux remarques s'imposent à propos de la première partie de ce travail. En premier lieu, les résultats obtenus interdisent de penser que les doses, relativement faibles, de Sm qui ont été utilisées n'atteignent que certains organismes tandis que d'autres échappent ou résistent à l'action de l'antibiotique. En effet, non seulement le dosage des chlorophylles montre un temps d'arrêt de la synthèse des chloroplastes qui peut être fort long (une dizaine de générations dans plusieurs cas), mais encore, tant que la synthèse des chloroplastes n'a pas repris, l'examen microscopique révèle une grande homogénéité de la population cellulaire du point de vue du nombre de chloroplastes par cellule. En second lieu, il est clair qu'un traitement des *Euglènes* par la Sm, qui a pour effet d'interrompre totalement la synthèse des chloroplastes pendant plusieurs générations, peut être suivi d'une reprise de cette synthèse.

Ainsi, toutes les cellules de la culture ont manifestement été touchées de la même manière durant la période d'action de la Sm. Pendant plusieurs générations, aucun chloroplaste n'a été synthétisé. Si l'action de la Sm a consisté à induire une mutation, elle l'a donc fait dans toutes les cellules, et tous les noyaux ou tous les chloroplastes ont été atteints. Or, l'inhibition est réversible pour certaines cellules. Il faut donc admettre soit que le Sm n'a pas provoqué de mutation, soit que le pourcentage de réversions est fort grand.

La deuxième partie du travail accentue encore la faiblesse de l'hypothèse d'une action mutagène de la Sm. Les résultats peuvent être résumés comme suit. Lorsque, à partir d'une culture d'*Euglènes* en milieu liquide, qui a subi l'action de la Sm pendant une durée brève, on disperse, à chaque génération, quelques milliers de cellules sur un milieu nutritif gélosé, de manière à pouvoir suivre individuellement les diverses lignées cellulaires, on constate que le pourcentage de lignées blanches ainsi obtenues augmente de génération en génération. Si le pourcentage de colonies blanches isolées par ce procédé à chaque génération était identique à celui des cellules ayant perdu tout chloroplaste, nous serions en droit de tirer sans équivoque la conclusion que la Sm a inhibé la reproduction des chloroplastes sans modifier irréversiblement leurs propriétés et que l'altération du patrimoine héréditaire qui en résulte est due simplement à la perte des chloroplastes. Cependant, le pourcentage de colonies blanches obtenu expérimentalement est, à chaque génération, plus élevé que celui qui était prévu, comme si tous les chloroplastes n'étaient pas capables de reprendre leur croissance, une fois la Sm disparue. Une telle situation n'a rien de surprenant si l'on tient compte des faits suivants.

La mortalité des cellules au sein d'une culture d'*Euglènes* en milieu liquide n'est pas négligeable (sans que l'allure exponentielle de la courbe de croissance en soit néanmoins altérée); sur milieu solide, elle est encore bien plus élevée. Si l'on dissocie une colonie, on y trouve un grand nombre de cellules mortes. La proportion de ces dernières augmente progressivement lorsque la colonie vieillit. Lorsqu'une cellule à un chloroplaste est seule à être responsable de la couleur verte d'une colonie, il y a d'autant plus de chances qu'elle meure avant d'avoir pu donner naissance à d'autres cellules à chloroplastes (ce qui a pour résultat de transformer la colonie qui devait être verte en une colonie blanche) que la dose de Sm à laquelle elle a été soumise était plus forte (et a donc interrompu la multiplication des chloroplastes pendant un temps plus long).

Il est également possible que le chloroplaste seul péricisse au sein d'une cellule qui n'en renferme qu'un exemplaire. Ceci est suggéré par l'observation que nous avons mentionnée plus haut et suivant laquelle, lorsque la période d'arrêt de la synthèse des chlorophylles se prolonge, la quantité totale de chlorophylle de la culture peut décroître transitoirement. Cette destruction d'une partie des chlorophylles pourrait correspondre à la disparition d'un certain nombre des chloroplastes, résultant de leur inertie métabolique. Dans ce cas également, chaque cellule dont le chloroplaste a été détruit donnera naissance à une lignée blanche.

Seul l'examen microscopique des Euglènes descendant de cellules à un chloroplaste et isolées à chaque génération permettra de donner une réponse définitive à cette question.

Reste à envisager la possibilité que la Sm crée, au sein du cytoplasme, des conditions rendant impossible la reproduction des chloroplastes. Si ces conditions défavorables disparaissent au moment où cesse l'action de la Sm, nous sommes évidemment ramenés au cas précédent. D'autre part, l'hypothèse d'une modification persistante du cytoplasme, au regard des faits connus actuellement, ne ferait que compliquer inutilement le problème et paraît injustifiée.

Ainsi, sous réserve d'une vérification directe, il faut admettre que la formation de lignées d'Euglènes incolores est le résultat de la perte des chloroplastes due à une simple inhibition temporaire de la synthèse des chloroplastes, accompagnée de la répartition de ces organites entre des cellules dont le nombre ne cesse d'augmenter. Remarquons que, dans nos expériences, s'il fallait adopter une terminologie devenue courante, l'action de la Sm serait qualifiée de "mutagène" dans le cas où la durée de l'inhibition de la multiplication des chloroplastes aura été suffisante pour que naissent des cellules sans chloroplaste et, au contraire, de non-mutagène si la durée de l'inhibition a été moins longue.

Les résultats présentés ci-dessus indiquent une fois de plus que la synthèse de chloroplastes par une cellule est subordonnée à la présence d'au moins un chloroplaste dans cette cellule, sans qu'aucun indice ne conduise à postuler l'existence de l'équivalent de gènes nucléaires au niveau des plastides.

Un fait remarquable est apparu au cours de cette étude. Les Euglènes dans lesquelles la multiplication des chloroplastes a repris après un traitement par la Sm ne forment pas de lignées à un chloroplaste comme on pouvait s'y attendre. Nées d'individus ne possédant plus qu'un seul chloroplaste, elles retrouvent, au bout de quelques générations, les 8 ou 10 chloroplastes des Euglènes qui n'ont pas été traitées. Ceci est dû au fait que, pendant ces quelques générations, le taux de croissance des chloroplastes dépasse celui des cellules, ainsi que le montre la Fig. 1.

Notons enfin, quoique la question ne puisse être discutée complètement ici, les analogies frappantes des effets de la Sm sur les chloroplastes des Euglènes avec l'action de l'euflavine sur les enzymes respiratoires de la levure (EPHRUSI⁹; SLONIMSKI^{10, 11}). Comme l'inhibition de l'adaptation respiratoire précède l'induction de la "mutation petite colonie", l'inhibition de la synthèse des chloroplastes précède l'apparition de lignées d'Euglènes incolores. De même, l'inhibition complète des synthèses étudiées n'est atteinte qu'après une latence indépendante de la dose d'inhibiteur utilisée. Bien que les résultats de Slonimski et les nôtres ne soient directement comparables, du fait de conditions expérimentales quelque peu différentes, il n'est pas exclu que, dans les deux cas, l'inhibition de la synthèse des constituants

du système et l'altération du patrimoine héréditaire représentent deux aspects d'un seul et même phénomène, le premier pouvant être réversible (si l'inhibiteur peut se retirer sans que les sites bloqués aient été modifiés ou détruits), le second, irréversible, l'irréversibilité pouvant n'être due qu'à la perte (par dilution) d'éléments doués de continuité génétique.

RÉSUMÉ

Lorsqu'une culture d'*Euglènes* est traitée par la streptomycine (Sm) pendant 2 à 10 % du temps de génération, puis est transférée dans un milieu normal, la synthèse des chloroplastes est totalement interrompue pendant plusieurs générations, puis reprend. Pendant la période transitoire d'inhibition de la multiplication des chloroplastes, ceux-ci sont distribués régulièrement entre les cellules filles, de telle sorte que la culture se trouve bientôt constituée d'un mélange de cellules à un chloroplaste et de cellules sans chloroplaste dont la proportion va croissant. Dès que la multiplication des chloroplastes reprend, le nombre de chloroplastes par cellule rejoint rapidement le niveau normal de 8 chloroplastes par cellule. Mais il subsiste cependant des cellules irréversiblement blanches qui sont à l'origine de lignées incolores.

Les résultats d'une étude des proportions des lignées blanches et vertes isolées par étalement sur milieu solide à chaque génération au cours de la première phase du phénomène sont compatibles avec l'idée que l'action de la Sm se borne à un abaissement sélectif du taux de croissance des chloroplastes qui ne peuvent réapparaître de novo dans une cellule qui a perdu jusqu'au dernier exemplaire de ces particules.

SUMMARY

When a culture of *Euglena* is treated with streptomycin (Sm) during 2 to 10 % of the generation time, and then transferred to normal medium, the formation of the chloroplasts is stopped for several generations and then resumes. During the period of transitory inhibition of the multiplication of the chloroplasts, the chloroplasts are equally distributed between the daughter cells, resulting in a mixture of cells with one chloroplast per cell and other cells without chloroplast (the number of these increasing with time). As soon as the multiplication of the chloroplasts resumes, the normal number of 8 chloroplasts per cell is rapidly recovered. But nevertheless there remains a number of definitely white cells (without chloroplasts) which gives rise to white clones.

The results of a study of the percentage of white to green clones isolated by plating once per generation during the first phase of the phenomenon agree with the idea that all that Sm does is to selectively decrease the growth rate of the chloroplasts which, when lost, cannot be formed de novo.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. LWOFF, *Unités biologiques douées de continuité génétique*, Ed. CNRS, Paris VIII (1949) 7.
- ² H. VON EULER, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, 25A (1947) 17.
- ³ M. BRACCO ET H. VON EULER, *Kem. Arb.*, 2 (1947) 10.
- ⁴ L. PROVASOLI, S. H. HUTNER ET A. SCHATZ, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 69 (1948) 279.
- ⁵ M. DE DEKEN-GRENSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 35.
- ⁶ S. H. HUTNER, L. PROVASOLI, E. L. R. STOKSTAD, C. E. HOFFMANN, M. BELT, A. L. FRANKLIN ET T. H. JUKES, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 70 (1949) 118.
- ⁷ D. PRAMER, *Science*, 121 (1955) 507.
- ⁸ D. PRAMER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 62 (1956) 265.
- ⁹ B. EPHRUSSI, *Nucleo-cytoplasmic Relations in Microorganisms*, Oxford Univ. Press, London, 1953 p. 13.
- ¹⁰ P. SLONIMSKI, *3rd Symposium Soc. Gen. Microbiol. Cambridge*, 1953 p. 76.
- ¹¹ P. SLONIMSKI, *3eme Congr. intern. biochim. Bruxelles, Conf. rapp.*, 1955, p. 242.

Reçu le 1 août, 1957