Etude autoradiographique de l'influence de la kinétine sur la synthèse des acides nucléiques et des protéines dans le méristème racinaire d'*Allium cepa*

M. J. OLSZEWSKA *)

Dans les recherches précédentes (Olszewska 1959) nous avons démontré l'effet stimulant de la kinétine (Miller, Skoog, Saltza, Strong 1955, Miller, Skoog, Okumura, Saltza, Strong 1955) sur l'incorporation de l'adénine $-8-^{14}\text{C}$ dans les acides nucléiques des cellules du méristème racinaire d'*Allium cepa*. Parmi les trois organites étudiés (le cytoplasme, le noyau, le nucléole) l'incorporation de l'adénine dans l'ARN du nucléole subit une activation particulièrement intense.

La kinétine employée en même temps que l'adénine radioactive inhibe pendant les 5 premières heures de son action l'incorporation de l'adénine surtout dans l'ARN du cytoplasme. Ce phénomène n'est pas lié avec une inhibition du métabolisme des acides nucléiques, parce que déjà après 5 heures d'action de la kinétine on a constaté une augmentation de l'activité mitotique.

Les expériences présentes ont pour but de suivre l'influence de la kinétine sur la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Comme un précurseur nous avons choisi le formiate radioactif, dont l'atome du carbone s'incorpore dans la structure de certains acides aminés ainsi que de bases puriques et pyrimidiques au cours de leurs biosynthèse.

Par égard au fait qu'après 5 heures d'action de la kinétine paraît son effet principal — le croisement de l'activité mitotique, nous avons, dans l'étude présente, limité la durée d'incubation avec précurseur radioactif à 5 heures.

Dans nos expériences a été employé le formiate de soude ^{14}C en concentration de $0,2\ \mu\text{M}/\text{ml}$, contenant $0,3\ \mu\text{C}/\text{ml}$ et la kinétine cristalline synthétisée par M. le Prof. Supniewski et coll. (1956) qui a bien voulu nous en donner.

*) Adresse permanente: Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie végétales, Université de Łódź, Pologne.

Le matériel a été préparé d'une manière semblable à celle employée pour les expériences avec l'adénine, c'est à dire les bulbes, dont les racines avaient été poussées dans de l'eau distillée, ont été soumis à trois espèces d'expériences:

I. Les bulbes ont été immergés pendant 18 h. dans la solution aqueuse de kinétine en conc. de $0,05 \mu\text{M/ml}$ et ensuite transportés dans la solution aqueuse du formiate ^{14}C .

II. Les bulbes ont été plongés dans la solution aqueuse de kinétine en conc. de $0,0125 \mu\text{M/ml}$, où on a ajouté le formiate ^{14}C .

III. Les bulbes ont été placés dans la solution aqueuse du formiate ^{14}C . Les racines provenant de cette expérience ont servi de matériel témoin.

Pour chaque espèce d'expérience les durées des incubations avec formiate radioactif ont été de 1, 3 et 5 heures. Les extrémités des racines ont été fixées dans un mélange de 95% d'alcool absolu et de 5% d'acide acétique glacial à -8°C pendant 4 heures, puis lavées pendant environ 15 h. dans de l'alcool absolu à la même température. Après l'inclusion dans la paraffine des coupes longitudinales d'une épaisseur de 8μ ont été effectuées. Les coupes déparaffinées ont été ensuite lavées pendant 1 h. dans une solution aqueuse du formiate de soude non marqué à la conc. de $0,2 \mu\text{M/ml}$.

Une série de coupes a été recouverte telle quelle d'émulsion Ilford G 5 „in gel form”, d'autres ont été traitées, avant l'application de l'émulsion sensible, aux traitements suivants:

1. $0,1 \text{ N HCl}$ pendant 10 min. à la temp. 20°C pour éliminer la fraction acidosoluble.

2. Les coupes traitées pendant 10 min. à $0,1 \text{ N HCl}$ ont été soumises à l'action de la ribonucléase cristalline (Armour) en conc. de $0,1 \text{ mg/ml}$ pendant 2 h. à temp. 37°C . Ces coupes ont été donc privées de la fraction acidosoluble et de l'ARN.

3. Les coupes privées de la fraction acidosoluble et de l'ARN (après le traitement comme en 2) ont été soumises à l'action de la désoxyribonucléase (N. C. B. 1 $\times$ crist.) en conc. de $0,1 \text{ mg/ml}$, tamponnée par Mg^{2+} pendant 2 h. à la temp. 37°C . La radioactivité de ces coupes pouvait être rapportée aux protéines.

Les autoradiogrammes ont été effectués suivant la technique décrite par A. F i c q (1955). La durée d'exposition a été de 3 jours.

Pour rapporter le nombre des traces à la surface de divers organites cellulaires, nous avons employé la méthode décrite précédemment (O l s z e w s k a 1959).

Nos résultats sont basés sur l'observation de coupes provenant de 10 racines pour chaque espèce d'expérience (soit au total 90 racines).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. Radioactivité totale.

Les résultats du comptage des traces présentés sur le tableau 1 démontrent que la kinétine influe sur l'intensité de l'incorporation du ^{14}C du formiate; cet effet se laisse constater déjà après 1 heure de l'action de la kinétine.

Le nombre des traces trouvé dans les racines prétraitées à la kinétine permet de constater une certaine influence sur l'incorporation du ^{14}C pendant 5 heures après l'élimination de la kinétine du milieu.

Tableau 1

Radioactivité totale exprimée en nombre de traces par $1000 \mu^2$ de surface du cytoplasme, du noyau et du nucléole des cellules du méristème racinaire d'*Allium cepa*.

Organite	Traitement	Durée d'incubation avec le formiate ^{14}C		
		1 h.	3 h.	5 h.
Cytoplasme	I. Prétraitement à la kinétine	0,58	0,81	1,31
	II. Mélange kinétine et formiate	0,53	1,35	1,43
	III. Témoins	0,35	0,70	0,90
Noyau	I. Prétraitement à la kinétine	2,32	2,73	3,72
	II. Mélange kinétine et formiate	2,15	4,54	4,93
	III. Témoins	1,19	2,09	2,09
Nucléole	I. Prétraitement à la kinétine	10,20	11,73	12,95
	II. Mélange kinétine et formiate	8,16	16,32	16,83
	III. Témoins	6,12	8,16	9,18

2. Fraction acidosoluble.

La radioactivité de la fraction acidosoluble est présentée sur le tableau 2. En examinant ces résultats il ne faut pas oublier que la méthode de fixation employée entraîne une perte — assez insignifiante — de la

fraction acidosoluble (Ficq, Errera 1955). La quantité absolue enlevée par la fixation est probablement égale pour tous les expériences. Mais, en cas d'incubation pendant 1 h. où la radioactivité totale est peu élevée, une radioactivité en apparence inférieure de cette fraction résulte d'une élimination due à la fixation.

Malgré toutes ces réserves on peut constater que la présence de la kinétine augmente la vitesse des processus de synthèse, ce qui s'exprime par la diminution de la part relative de la fraction acidosoluble après 5 h. d'incubation dans le mélange de kinétine et de formiate. Encore après 3 h. d'incubation dans le matériel prétraité à la kinétine son influence se laisse constater grâce à la participation réduite de la fraction acidosoluble. Dans le matériel prétraité à la kinétine et dans le matériel témoin on trouve après 5 h. d'incubation une même valeur relative de la fraction acidosoluble.

Tableau 2

Radioactivité de la fraction acidosoluble exprimée en nombre de traces par 1000 μ^2 de surface du cytoplasme, du noyau et du nucléole des cellules du méristème racinaire d'*Allium cepa*.

Orga- nite	Traitement	Durée d'incubation avec le formiate ¹⁴ C		
		1 h.	3 h.	5 h.
Cytoplasme	I. Prétraitement à la kinétine	0,28 48 %	0,55 68 %	0,82 69 %
	II. Mélange kinétine et formiate	0,27 51 %	0,97 72 %	0,79 55 %
	III. Témoins	0,22 62 %	0,54 77 %	0,62 69 %
Noyau	I. Prétraitement à la kinétine	1,22 52 %	1,22 44 %	1,96 52 %
	II. Mélange kinétine et formiate	1,15 51 %	2,56 56 %	2,08 41 %
	III. Témoins	0,66 55 %	1,31 62 %	0,76 36 %
Nucléole	I. Prétraitement à la kinétine	5,65 55 %	5,61 48 %	7,34 62 %
	II. Mélange kinétine et formiate	2,76 33 %	9,69 53 %	5,61 33 %
	III. Témoins	4,08 66 %	5,83 71 %	5,61 61 %

3. Acide ribonucléique.

Les données présentées sur le tableau 3 montrent que déjà après 1 heure d'action la kinétine augmente la synthèse d'ARN dans tous les organites étudiés.

Chez les plantes prétraitées à la kinétine après quelques heures encore après l'élimination de la kinétine du milieu la synthèse d'ARN est plus intense que dans le matériel témoin.

Dans le matériel soumis à l'action de la kinétine en même temps qu'à l'action du formiate radioactif le nombre de traces contenu dans l'ARN du noyau est après 1 heure d'incubation 7 fois plus élevé que le nombre de traces des plantes témoins; en ce qui concerne le cytoplasme, la radioactivité d'ARN des plantes soumises à l'action du mélange de kinétine et de formiate dépasse celle des plantes témoins 4 fois seulement. Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec l'adénine radioactive (O1-

Tableau 3

Radioactivité de la fraction d'ARN exprimée en nombre de traces par 1000 μ^2 de surface du cytoplasme, du noyau et du nucléole des cellules du méristème racinaire d'*Allium cepa*

Orga- nite	Traitement	Durée d'incubation avec le formiate ^{14}C		
		1 h.	3 h.	5 h.
Cytoplasme	I. Prétraitement à la kinétine	0,08	0,18	0,15
	II. Mélange kinéti- ne et formiate	0,16	0,15	0,37
	III. Témoins	0,04	0,07	0,10
Noyau	I. Prétraitement à la kinétine	0,50	0,81	1,11
	II. Mélange kinéti- ne et formiate	0,71	1,39	2,21
	III. Témoins	0,11	0,23	0,69
Nucléole	I. Prétraitement à la kinétine	3,06	3,57	3,57
	II. Mélange kinéti- ne et formiate	4,38	4,59	9,52
	III. Témoins	1,98	2,04	2,04

s z e w s k a 1959); ils semblent montrer que la kinétine augmente surtout la synthèse d'ARN du noyau.

4. Acide désoxyribonucléique.

Les résultats concernant le nombre de traces contenues dans l'ADN (tableau 4) ne concordent pas avec le phénomène de l'augmentation de l'activité mitotique produite par l'action de la kinétine (G u t t m a n 1956, O l s z e w s k a 1959).

Tableau 4

Radioactivité de la fraction d'ADN exprimée en nombre de traces par 1000 μ^2 de surface du noyau des cellules du méristème racinaire d'*Allium cepa*

Traitement	Durée d'incubation avec le formiate ¹⁴ C		
	1 h.	3 h.	5 h.
I. Prétraitement à la kinétine	0,40	0,46	0,58
II. Mélange kinétine et formiate	0,27	0,36	0,50
III. Témoins	0,23	0,34	0,40

La contradiction de ces résultats peut être causée par le dénombrement des traces qui désorlaient exclusivement des noyaux de cellules typiquement interphasales; nos résultats concernent donc seulement l'étape second, préprophasique de la synthèse d'ADN. La plupart des auteurs (Fautrez, Fautrez et Roels 1954, Lison et Pasteels 1950, Pisi et Cavalli 1955) estime que cette synthèse se produit en deux temps: l'un posttélphasique, l'autre préprophasique. La réduction de la durée de l'interphase qui arrive sous l'influence de la kinétine (G u t t m a n 1956) pourrait être attribuée à l'accélération de la synthèse posttélphasique d'ADN. Le matériel prétraité à la kinétine dont l'activité mitotique dans un temps correspondant à 1 et 3 h. d'incubation est la plus élevée (O l s z e w s k a 1959) démontre pendant les 5 heures d'incubation le plus grand nombre de traces dans l'ADN. Ces traces pourraient donc provenir du ¹⁴C incorporé pendant l'étape posttélphasique de la synthèse d'ADN. Cette supposition exige évidemment de nouvelles recherches réalisées à l'aide d'un précurseur spécifique d'ADN.

5. Les protéines.

Le nombre de traces démontré par les protéines (tableau 5) prouve que pendant 5 heures d'incubation la synthèse protéique la plus intense se

produit dans le matériel prétraité à la kinétine avant l'incubation avec le formiate radioactif. La radioactivité des protéines dans les plantes témoins est toujours la plus faible.

Tableau 5

Radioactivité de la fraction des protéines exprimée par nombre de traces par 1 cellule du méristème radiculaire d'*Allium cepa*

Traitement	Durée d'incubation avec le formiate		
	1 h.	3 h.	5 h.
I. Prétraitement à la kinétine	0,085	0,120	0,160
II. Mélange kinétine et formiate	0,040	0,080	0,152
III. Témoins	0,025	0,055	0,082

DISCUSSION

Les résultats des recherches présentes ne démontrent aucun effet inhibiteur de la kinétine sur la synthèse d'ARN. On peut donc conclure que cette inhibition constatée dans les expériences avec l'adénine radioactive Olszewska 1959 employée en même temps que la kinétine ne signifie pas d'un affaiblissement de l'activité métabolique des acides nucléiques, mais pourrait être causée par le phénomène de la compétition entre la molécule d'adénine et celle de kinétine.

La comparaison de la radioactivité de l'ARN et des protéines indique que la kinétine stimule la synthèse des protéines par l'intermédiaire de la synthèse accrue de l'ARN: après l'introduction de la kinétine dans le tissu, la synthèse intense d'ARN précède l'augmentation de la synthèse protéique. Après l'élimination de la kinétine du milieu la synthèse d'ARN baisse, tandis que la synthèse protéique élevée se maintient pendant un certain temps. Ces faits deviennent compréhensibles à la lumière de l'hypothèse émise par Brachet (1941) et Caspersson (1941) sur le rôle de l'ARN dans la synthèse des protéines.

Les recherches d'origine d'ARN du cytoplasme ont démontré qu'on peut distinguer, selon les objets, deux possibilités différentes. Chez *Ace-tabularia* la synthèse de l'ARN du cytoplasme est — jusqu'à un certain temps — indépendante de la présence du noyau (Brachet, Chantrenne, Vanderhaeghe 1955, Brachet, Chantrenne 1956, Vanderhaeghe 1957). Chez les *Amibes*, par contre, le noyau exerce un contrôle étroit sur le maintien de l'ARN cytoplasmiques qui est syn-

thétisé dans le noyau (ou bien dans le nucléole), puis transféré au cytoplasme (Brachet 1955, Goldstein, Plaut 1955, Prescott 1957). Suivant Brachet et Ficq (1956) et Brachet (1957) ces deux mécanismes peuvent co-exister. On peut donc se demander si la kinétine agit particulièrement sur l'un de ces mécanismes ou si elle augmente dans la même mesure la synthèse cytoplasmique et nucléaire d'ARN.

Les résultats obtenus par Guttman (1957) qui a constaté une augmentation de la quantité d'ARN contenue dans le noyau sous l'influence de la kinétine, et surtout les résultats des recherches autoradiographiques démontrent qu'une stimulation exercée par la kinétine atteint plutôt la synthèse d'ARN du noyau que celle du cytoplasme. Il semble donc possible que l'action de la kinétine consiste dans une activation du mécanisme nucléaire d'origine d'ARN cytoplasmique.

Dernièrement on a constaté dans le noyau la présence de deux espèces d'ARN, dont l'activité métabolique est différente (Kay, Smellie, Humphrey, Davidson 1956, Logan, Davidson 1957, Logan 1957, Vincent 1957). Il s'agit en effet d'ARN nucléaire et non nucléolaire, comme pourrait le suggérer les résultats d'Allfrey et Mirsky (1957), parce que dans les expériences de Vincent (1957) le nucléole a été éliminé. L'action de la kinétine pourrait donc être attribuée à une augmentation de la synthèse de cette espèce d'ARN, dont l'activité métabolique est plus considérable.

Les résultats obtenus concernant le mode d'action de la kinétine ne permettent pas de conclure que la première impulsion exercée par cette dernière consiste dans une stimulation de la synthèse d'ARN, car la synthèse d'ARN accrue peut être un résultat de l'action de la kinétine sur les autres centres du métabolisme cellulaire.

RÉSUMÉ

On a étudié par autoradiographie l'influence de la kinétine sur l'incorporation du ^{14}C du formiate dans les acides nucléiques et dans les protéines. Les résultats obtenus montrent que la kinétine stimule la synthèse protéique par l'intermédiaire de la synthèse accrue d'ARN. On a constaté la plus grande croissance de la synthèse d'ARN du noyau.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde reconnaissance à M. le Professeur J. Brachet qui m'avait accueillie au Laboratoire de Morphologie Animale et n'avait jamais manqué de me témoigner toute sa bienveillance. J'adresse à Mme dr A. Ficq mes vifs remerciements pour l'intérêt qu'elle porta à mes recherches et pour les conseils précieux qu'elle m'a dispensés. Je voudrais exprimer ma gratitude à Mlle R. Tencer qui a suivi de très près mon travail et m'a beaucoup aidé par ses conseils.

STRESZCZENIE

Badano metodą autoradiograficzną wpływ kinetyny na włączanie się ^{14}C mrówczanu sodu do kwasów nukleinowych i białek merystemu korzeniowego *Allium cepa*. Uzyskane rezultaty wskazują, że kinetyna stymuluje syntezę białkową za pośrednictwem wzmożonej syntezy kwasu rybonukleinowego. Stwierdzono, że pod wpływem kinetyny najbardziej zwiększa się synteza kwasu rybonukleinowego jądrowego.

BIBLIOGRAPHIE

- Allfrey V. C., Mirsky A. E., 1957, Proc. Natl. Ac. Sci. 43: 821.
Brachet J., 1941, Enzymologia 10: 87.
Brachet J., 1955, Biochim. Bioph. Acta 18: 247.
Brachet J., 1957, Biochimija 22: 226.
Brachet J., Chantrenne H., 1956, Cold Spring Harb. Symp. 21: 329.
Brachet J., Chantrenne H., Vanderhaeghe F., 1955, Biochim. Bioph. Acta 18: 544.
Brachet J., Ficq A., 1956, Arch. Biol. 67: 431.
Caspersson T. O., 1941, Naturwiss. 28: 33.
Fautrez J., Fautrez-Firlefyn N., 1953, Nature 172: 119.
Fautrez J., Roels H., 1954, Arch. Biol. 65: 459.
Ficq A., 1955, Arch. Biol., 66: 509.
Ficq A., Errera M., 1955, Biochim. Bioph. Acta 16: 45.
Goldstein L., Plaut W., 1955, Proc. Natl. Ac. Sci. 41: 874.
Guttman R., 1956, Chromosoma 8: 341.
Guttman R., 1957, J. Bioch. Bioph. Cytology 3: 129.
Kay B. R. M., Smellie R. M. S., Humphrey G. F., Davidson J. N., 1956, Biochem. J. 62: 160.
Lison L., Pasteels J., 1950, Bull. Acad. roy. Belg. Cl. d. Sc. 36: 348.
Logan R., 1957, Biochim. Bioph. Acta 26: 227.
Logan R., Davidson J. N., 1957, Biochim. Bioph. Acta 24: 196.
Miller C., Skoog F., Saltza N., Strong F., 1955, J. Amer. Chem. Soc. 77: 1392.
Miller C., Skoog F., Okumura F., Saltza N., Strong F., 1955, J. Amer. Chem. Soc. 77: 2662.
Olszewska M. J., 1959, Experim. Cell Res. 16: 193.
Pisi E., Cavalli G., 1955, Arch. Biol. 66: 437.
Prescott D. M., 1957, Experim. Cell Res. 12: 196.
Supniewski J., Bany T., 1956, Bull. Ac. Sc. Pol. ser. biol. 4: 361.
Vanderhaeghe-Hougardy F., 1957, Thèse Doctorat, Université libre de Bruxelles.
Vincent W. S., 1957, Science 126: 306.