

## INTERPRETATION CYTOPHOTOMETRIQUE DES PHENOMENES MICRONUCLEAIRES AU COURS DE LA DIVISION BINAIRE ET DES DIVISIONS PRÉGAMIQUES CHEZ *PARAMECIUM TRICHIUM*

J. PIERI, C. VAUGIEN, ET M. TROUILLIER. From Laboratoire de Biologie  
Moléculaire et Physico-chimique, Faculté des Sciences, Nantes, France

Le phénomène général de la biosynthèse de l'ADN au cours de la division cellulaire et au cours de la méiose a fait l'objet de nombreux travaux.

Au moyen de techniques diverses, cytophotométriques et radioautographiques, un grand nombre de résultats a été obtenu concernant la teneur en ADN des noyaux cellulaires des tissus des métazoaires. En ce qui concerne les protozoaires et en particulier les ciliés, seule la synthèse de l'ADN au cours du cycle mitotique a été étudiée (3, 5, 6, 8, 10, 11). Les résultats ayant trait à la division du micronucleus montrent une grande variabilité du phénomène selon les espèces. Chez certaines la synthèse a lieu au début de l'intercinèse, chez d'autres en fin d'intercinèse. Pour notre part nous avons voulu savoir à quel moment du cycle micronucléaire prenait place la synthèse de l'ADN chez *Paramecium trichium*. Notre étude a consisté à déterminer par microphotométrie dans le visible les variations de la quantité relative de l'ADN micronucléaire au cours du cycle mitotique en se basant sur des critères morphologiques macronucléaires.

Les variations de la teneur en ADN se produisant au cours de la méiose ont été étudiées quantitativement par la méthode histophotométrique. Les travaux (2, 7, 9) ont porté sur diverses espèces d'invertébrés ou de vertébrés, soit sur la spermatogénèse, soit sur l'ovogénèse. Les auteurs concluent qu'il existe au point de vue de la quantité d'ADN un rapport 4:2:1 entre les "cytes" de premier ordre, les cytes de second ordre et les "tides." Chez les ciliés il existe trois divisions pré-gamiques précédant la formation du syncaryon. Au cours de ces divisions se produit une méiose. Par cytophotométrie, Piéri (4) a montré chez *Stylonychia pustulata* qu'il existe un rapport 4:2:1

entre les deux premières divisions pré-gamiques, alors que la troisième division est une mitose normale et se déroule selon un rapport 1:2:1. Nous nous sommes proposés de vérifier si chez *Paramecium trichium* les mêmes rapports se retrouvent au cours des divisions pré-gamiques.

### MATERIEL ET METHODES

Les infusoires sont cultivés en tubes à essais sur milieu synthétique avec 0, 15% de bacto-tryptone, 0, 06% de yeast extract, 0, 1% de glucose et des sels. La durée moyenne d'une génération à 18°C est de 22 heures environ. Prélevés au hasard, les ciliés sont fixés au formol à 10%, étalés sur lames avec de la gélose formolée et colorés selon la méthode de feulgen.

Les mesures ont été réalisées en lumière transmise à l'aide du microphotomètre de Leitz adapté sur un microscope Ortholux. Pour notre matériel, nous avons choisi un filtre spectral de 530 m $\mu$  de façon à éliminer en partie l'erreur distributionnelle tout en ayant des transmissions comprises entre 10 et 60%.

La quantité relative (Q) de l'ADN est obtenue en multipliant la surface réelle (S) du noyau, exprimée en microns carrés, par sa densité optique (DO), selon la méthode de Lison (1):  $Q = S \times DO$ . Les mesures des micronuclei sont faites à l'aide d'un micromètre oculaire à tambour de Leitz. Les micronuclei ayant une forme géométrique régulière, sphérique ou ellipsoïdale en fonction du stade considéré, nous avons calculé soit la surface d'un cercle en mesurant le rayon, soit la surface d'une ellipse en mesurant le petit axe et le grand axe; dans ce dernier cas, les deux valeurs sont généralement voisines l'une de l'autre, sauf pour un stade, celui de l'anaphase. Nous avons effectué plusieurs mesures de la densité optique, mesures voisines du centre du noyau, et nous avons considéré la moyenne de ces mesures, ceci afin de pallier à une possible hétérogénéité du noyau. La densité optique est donnée par la formule:  $DO =$

— log  $T$ ,  $T$  étant la transmission, c'est-à-dire la fraction de lumière initiale non absorbée. Les valeurs ainsi obtenues sont relatives et ne représentent que des valeurs comparatives. Les taux d'ADN sont exprimés en unités arbitraires.

## RESULTATS

### *Variation du Taux de l'ADN Micronucléaire au Cours de la Division Binaire*

Chez ce cilié, la division du micronucleus est très nette et les diverses étapes sont marquées par différents aspects du macronucleus. Les critères morphologiques micronucléaires nous ont permis de distinguer six stades au cours de la division binaire de cet infusoire. Au stade 1 le micronucleus vient de se diviser. Les micronuclei fils sont très près l'un de l'autre. Leur taux d'ADN équivaut à deux  $n$  chromosomes. Au stade 2 les micronuclei

TABLEAU I  
*Surface et Taux d'ADN des Micronuclei au Cours des Différents Stades de la Division Mitotique*

Stades	Nom- bre de mesures	Surface moyenne du micronucleus	Taux moyen d'ADN du micronucleus en unités arbitraires
$\mu^2$			
Stade 1	20	30,62 $\pm$ 1,28	41,05 $\pm$ 1,26
Stade 2	48	29,68 $\pm$ 1,03	42,50 $\pm$ 0,67
Stade 3	38	30,55 $\pm$ 1,10	43,15 $\pm$ 0,70
Stade 4	32	30,04 $\pm$ 0,86	42,97 $\pm$ 1,11
Stade 5	48	46,62 $\pm$ 1,26	73,07 $\pm$ 1,03
Stade 6	4	62,82 $\pm$ 5,60	76,82 $\pm$ 7,25

TABLEAU II  
*Fréquences et Taux d'ADN des Différents Stades de la Division Mitotique*

Stades	Fré- quences réelles	Fréquences cumulées rela- tives exprimées en pourcentage du temps d'une génération	Taux de l'ADN micronucléaire
$\%$			
Stade 1	32	5,66	41,05 $\pm$ 1,26
Stade 2	40	12,74	42,59 $\pm$ 0,67
Stade 3	73	25,66	43,15 $\pm$ 0,70
Stade 4	346	86,90	42,97 $\pm$ 1,11
Stade 5	70	99,29	73,07 $\pm$ 1,03
Stade 6	4	100,00	76,82 $\pm$ 7,25

TABLEAU III  
*Taux de l'ADN Micronucléaire au Cours des Divisions Prégamiques*

Stades	Nombre de mesures	Taux moyen de l'ADN Micronucléaire
1, Micronuclei en dé- but de prophase de lère division pré- gamique	14	40,01 $\pm$ 1,14
2, Micronuclei en fin de prophase de pre- mière division pré- gamique	39	80,98 $\pm$ 0,68
3, Micronuclei en fin de première division prégamique	41	39,51 $\pm$ 0,44
4, Micronuclei au cours de la deuxième division prégamique	35	40,04 $\pm$ 0,43
5, Micronuclei en fin de deuxième division Prégamique	4	19,72 $\pm$ 4,85
6, Micronuclei au cours de la troisième division prégamique	7	40,61 $\pm$ 1,73
7, Micronuclei en fin de troisième division prégamique	13	21,54 $\pm$ 1,25

fils sont éloignés l'un de l'autre. Le macronucleus s'est étiré. La cytodièrese commence. Au stade 3 le macronucleus allongé caractérise les infusoires néoformés. Le stade 4 est représenté en général par de nombreux individus. Il s'agit d'infusoires à l'interphase présentant un appareil nucléaire classique. Pour le stade 5 nous avons groupé tous les individus présentant un macronucleus festonné qui ébauche un allongement. On note une augmentation de la surface apparente du micronucleus. Au Stade 6 le micronucleus est de forme elliptique, en anaphase; son taux d'ADN équivaut à quatre  $n$  chromosomes.

L'erreur standard importante qui augmente l'intervalle de confiance au stade 6 est due au petit nombre d'individus rencontrés à ce stade d'anaphase, très bref.

N'ayant pu calculer la durée d'un stade, nous avons pris comme paramètre la fréquence de chacun des six stades et nous avons considéré que le temps d'un stade est proportionnel à la fréquence du stade sur la lame. Les résultats sont groupés dans le tableau II. Nous avons porté en

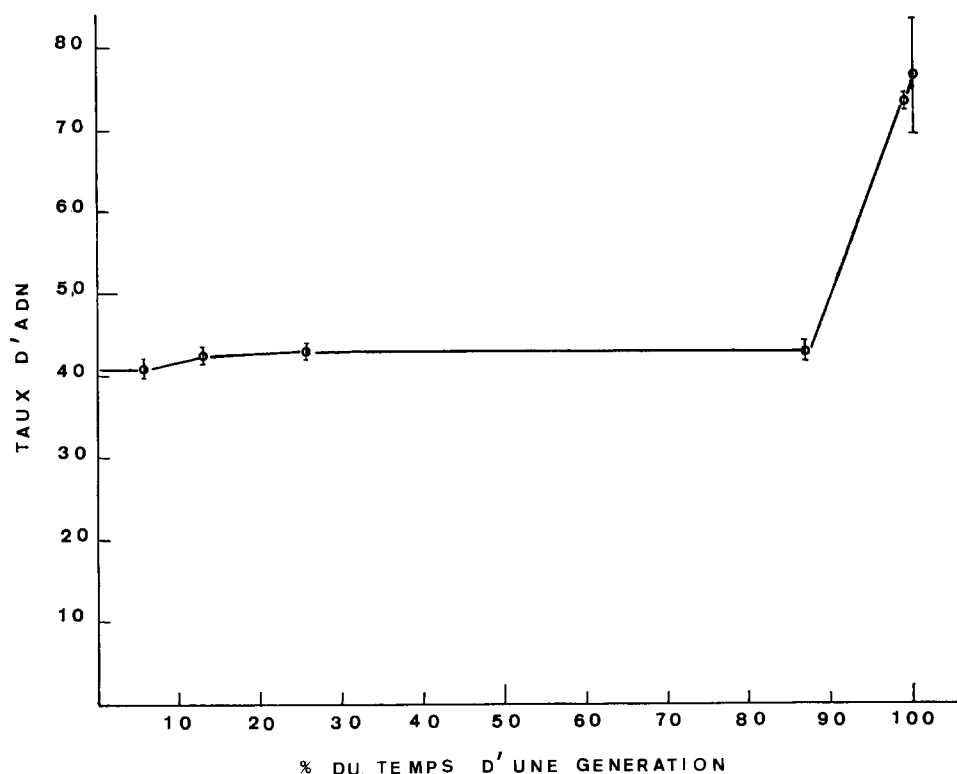


FIGURE 1 Variation du taux d'ADN micronucléaire au cours du cycle mitotique. En abscisses, pour chaque stade est porté le pourcentage du temps d'une génération.

abscisses le pourcentage du temps d'une génération ainsi calculé et en ordonnées les taux d'ADN correspondants, la durée d'un cycle mitotique étant 100% du temps (Fig. 1).

#### *Variation du Taux d'ADN Micronucléaire au Cours des Divisions Prégamiques*

Les divisions prégamiques des micronucléi sont bien visibles et le plus souvent synchrones. Nous avons noté une première division prégamique différente des divisions suivantes, caractérisée par un gonflement micronucléaire important. Les micronucléi sont de taille notable et de forme régulière facilitant les mesures cytophotométriques.

Au cours des divisions prégamiques, on n'observe pas d'éclatement macronucléaire et de ce fait, il ne peut pas exister de confusion concernant les mesures micronucléaires. A la fin de la deuxième division prégamique, l'étirement et l'enroulement du macronucléus sont très importants et de ce fait masquent souvent les micronucléi. C'est pourquoi de bonnes mesures n'ont pu être faites à ce stade

que sur un petit nombre d'individus. En conséquence, l'erreur standard est augmentée et l'intervalle de confiance élargi comme on peut le voir dans le tableau III. Nous avons groupé les résultats du tableau III dans Fig. 2 en portant en abscisses les différents stades et en ordonnées les taux d'ADN correspondants.

#### INTERPRETATION ET DISCUSSION

En ce qui concerne la division du micronucléus il ressort du tableau I qu'entre les stades 1, 2, 3, et 4 on ne note pas de variations de la surface ni du taux d'ADN. Par contre au stade 5 on enregistre une augmentation très nette de la surface et du taux de l'ADN. Or à ce stade le macronucléus s'allonge, ce qui caractérise des ciliés entrant en division. Au stade 6 les valeurs trouvées pour la surface et le taux de l'ADN sont sensiblement le double des valeurs rencontrées aux stades 1, 2, 3, et 4. Il apparaît donc que la synthèse de l'ADN du micronucléus s'effectue en grande partie au stade 5 et se poursuit au stade 6 où elle s'achève.

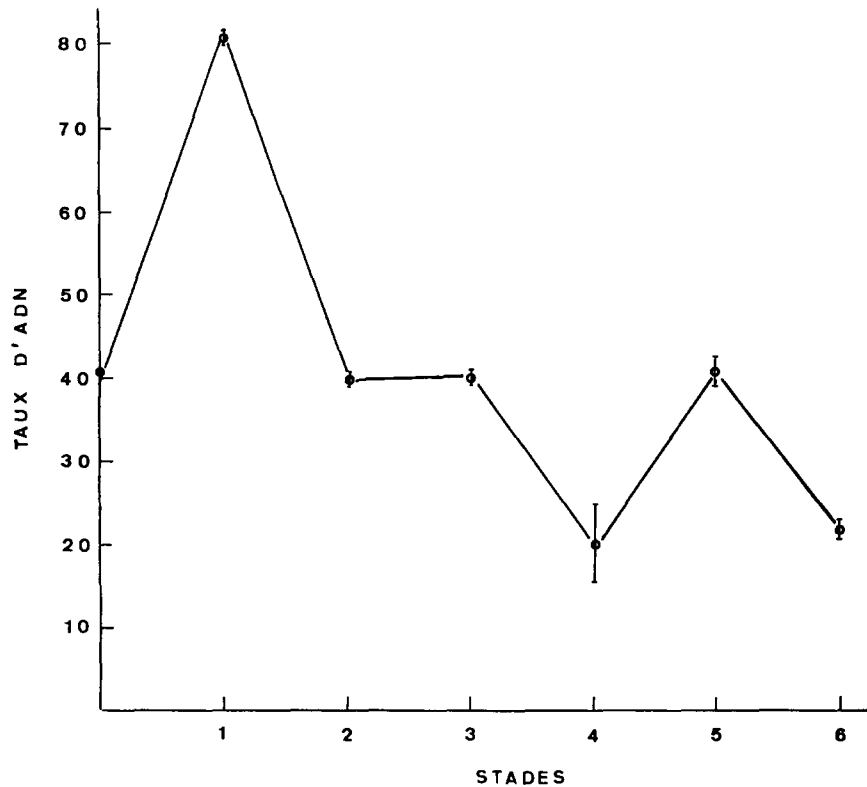


FIGURE 2 Variation du taux d'ADN micronucléaire au cours des trois divisions pré-gamiques.

Chez *Paramecium trichium* la synthèse de l'ADN du micronucleus s'effectue bien après la cytotidérèse, juste avant la division suivante, soit après l'interphase (Fig. 1). Par conséquent dans une population de ce cilié, la quantité moyenne de l'ADN micronucléaire se rapproche de celle qui correspond à deux  $n$  chromosomes.

Ces résultats sont voisins de ceux trouvés chez d'autres paramécies. En effet chez *Paramecium aurelia*, Woodard et collab. (11) en se servant des méthodes cytophotométriques montrent que la synthèse de l'ADN du micronucleus débute au commencement de la seconde moitié de l'interphase. Walker et Mitchison (10) par photométrie chez *Paramecium caudatum* situent cette synthèse en fin d'interphase.

Par contre Seshachar (8) chez *Chilodonella uncinata* par photométrie et MacDonald (3) chez *Tetrahymena pyriformis* par incorporation de thymidine tritiée montrent que la duplication de l'ADN s'effectue juste après la mitose. Chez *Euplotes eurytomus* Prescott et collab. (6) par microspectrographie d'échantillons colorés au Feulgen

montrent que le taux d'ADN micronucléaire double entre l'anaphase et le début de l'interphase. De même Piéri (5) chez *Glaucoma scintillans*, par cytophotométrie en se basant sur des critères morphologiques macronucléaires, conclue que la synthèse de l'ADN micronucléaire débute juste après la division de cet organisme et se continue après la bipartition.

Pour les divisions pré-gamiques les résultats obtenus groupés dans le tableau III montrent que le taux moyen de l'ADN des individus en début de prophase de première division est voisin de celui rencontré chez les individus neutres. Donc à ce stade les individus présenteraient un taux d'ADN correspondant à deux  $n$  chromosomes.

En fin de prophase, le taux moyen de l'ADN est doublé et correspondrait à quatre  $n$  chromosomes. En fin de première division chaque micronucleus formé a un taux moyen d'ADN égal à la moitié du taux obtenu en fin de prophase. On n'observe pas de synthèse d'ADN au cours de la deuxième division pré-gamique. A la fin de cette deuxième division, les quatre micronuclei formés ont un taux

moyen d'ADN égal à la moitié du taux précédent, soit à  $n$  chromosomes. La mise en charge de l'ADN préparant les deux premières divisions pré-gamiques a lieu à la prophase de la première division.

Au cours des deux premières divisions pré-gamiques, les taux moyens de l'ADN micronucléaire varient dans un rapport 4:2:1. La première division serait réductionnelle, la seconde équationnelle, les deux divisions constituant la méiose.

La troisième division pré-gamique qui donne naissance aux pronuclei se déroule avec synthèse de l'ADN. Elle évolue dans le rapport 1:2:1. Elle serait équationnelle et représenterait une mitose normale.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par la même méthode par Piéri (4) chez *Stylonychia pustulata* et correspondraient aux rapports trouvés sur la lignée germinale des métazoaires entre les cytes de premier ordre, les cytes de second ordre, et les tides.

Le fait que les micronuclei des individus en début de prophase aient un taux d'ADN voisin de

celui des micronuclei des individus végétatifs a été signalé par Woodard et collab. (12). Ces auteurs montrent de même que durant les premières minutes de la conjugaison le taux d'ADN des micronuclei double. Mais ils n'ont pas rapportés cytochimiquement la réduction de l'ADN durant les processus méiotiques.

L'évolution dans le temps de la synthèse de l'ADN à la méiose ne se produirait pas comme pourrait le faire supposer l'évolution du nombre des chromosomes. Ces derniers se dédoublent à la deuxième division de maturation sans qu'il y ait eu synthèse à l'occasion de celle-ci. Cette deuxième division se produit peu de temps après la fin de la première. La mitose réductionnelle a lieu à la première division pré-gamique. La mise en charge de l'ADN s'effectue bien au cours de cette prophase; il y a doublement du taux d'ADN et le stade diplotène correspondrait à quatre charges en ADN, chaque chromatide ayant une charge.

Received for publication 8 August 1967, and in revised form 6 November, 1967.

#### REFERENCES

1. LISON, L. 1960. Histochimie et Cytochimie Animales. Gauthier-Villars, Paris.
2. LISON, L., et J. PASTEELS. 1949. Quantitative development of thymonucleic acid during spermatogenesis in the garden mole. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **143**: 1607.
3. MAC DONALD, B. B. 1962. Time of DNA synthesis in micro and macronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* **13**: 193.
4. PIERI, J. 1965. Interprétation cytophotométrique des phénomènes nucléaires au cours de la conjugaison chez *Stylonychia pustulata*. *Compt. Rend.* **261**: 2742.
5. PIERI, J. 1966. Etude cytophotométrique de la quantité relative de l'ADN micronucléaire au cours de la division binaire normale chez *Glaucoma scintillans*. *Compt. Rend.* **262**: 775.
6. PRESCOTT, D. M., R. F. KIMBALL, et R. F. CARRIER. 1962. Comparison between the timing of micronuclear and macronuclear synthesis in *Euplotes eurytomus*. *J. Cell Biol.* **13**: 175.
7. SCHRADER, F., et C. LEUCHTENBERGER. 1950. Cytochemical analysis of the functional relation of the various cell structures of *Arvelius albobunctatus*. *Exptl. Cell Res.* **1**: 421.
8. SESHACHAR, B. R. 1950. Desoxyribonucleic acid content of the ciliate micronucleus. *Nature*. **165**: 848.
9. SWIFT, H., et R. KLEINFELD. 1953. Desoxyribonucleic acid in grasshopper spermatogenesis, oögenesis and cleavage. *Physiol. Zool.* **26**: 301.
10. WALKER, P. M. B., et J. M. MITCHISON. 1957. DNA synthesis in two ciliates. *Exptl. Cell Res.* **13**: 167.
11. WOODARD, J., B. GELBER, and H. SWIFT. 1961. Nucleoprotein changes during the mitotic cycle in *Paramecium aurelia*. *Exptl. Cell Res.* **23**: 258.
12. WOODARD, J., M. WOODARD, B. GELBER, and H. SWIFT. 1966. Cytochemical studies of conjugation in *Paramecium aurelia*. *Exptl. Cell Res.* **44**: 55.