

LA SYNTHÈSE DE L'ADN MITOCHONDRIAL CHEZ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

Etude Radioautographique Quantitative au Microscope Électronique

RENÉE CHARRET et JEAN ANDRÉ

From the Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, Faculté des Sciences, 91 Orsay, France

ABSTRACT

Electron microscopic radioautography has been used to study the synthesis of mitochondrial DNA after incorporation of thymidine-³H by cultures in logarithmic phase of *Tetrahymena pyriformis* during periods ranging from 15 min to 12 hr. The great majority of silver grains are distributed over the macronuclei, the micronuclei, and the mitochondria. The intensity of the label over the entire mitochondrial population is a function of the length of the incubation period within the time interval considered. The intensity of the mitochondrial label was compared with that of the nuclear label. Mitochondria incorporate at the same rate whether the nuclei are synthesizing or not. This persistence of mitochondrial incorporation in the absence of nuclear incorporation excludes the hypothesis of a nuclear origin for mitochondrial DNA. We are not able to determine whether the apparent continuity of synthesis in the entire mitochondrial population of a cell actually represents a series of asynchronous discontinuities.

INTRODUCTION

Après avoir été longtemps contestée, l'existence de l'ADN cytoplasmique n'est plus à démontrer, et il est maintenant bien connu, à la suite d'un bon nombre de travaux (Hoff-Jørgensen et Zeuthen, 1952; Steinert, 1960; Chèvremont et al., 1961; Ris et Plaut, 1962; Chèvremont, 1963; Nass et Nass, 1963; Luck et Reich, 1964; Chèvremont, 1965; Nass et al., 1965; Kislev et al., 1965; Schuster, 1965; Bisalputra et Bisalputra, 1967; Granick et Gibor, 1967), que cet ADN est lié aux structures mitochondriales, kinétoplastiques, ou chloroplastiques. Cet ADN possède des propriétés biochimiques qui le différencient de l'ADN nucléaire (Suyama et Preer, 1965; Kroon, 1966; Sinclair, 1966; Moustacchi et Williamson, 1966; Borst et al., 1967 *a, b* et *c*; Dawid et Wolstenholme,

1967; Mounolou, 1967; Pikó et al., 1967): son poids moléculaire est très bas, et, pour un bon nombre d'organismes, sa densité de flottaison est faible, de même que le rapport des bases GC/AT. On sait aussi que sa molécule est le plus souvent circulaire, d'une longueur d'environ 5 μ (Nass, 1966; Sinclair et Stevens, 1966; Van Bruggen et al., 1966) et qu'il est dépourvu d'histones (Steinert, 1965).

L'existence d'ADN hors du noyau pose évidemment le problème de ses rapports avec l'ADN nucléaire: l'ADN cytoplasmique et l'ADN nucléaire ont-ils la même origine dans la cellule et, sinon, leur synthèse obéit-elle aux mêmes modalités chronologiques au cours du cycle cellulaire? Chèvremont (1963) envisage le

premier ce problème. Dans des fibroblastes de poulet soumis à des conditions de cultures particulières, il voit une accumulation d'ADN dans les mitochondries. Il interprète ce fait comme montrant que l'ADN est normalement synthétisé par les mitochondries qui le transfèrent ensuite au noyau. Les travaux qui suivent apportent des conclusions différentes. Pour Bell et Mühlethaler (1964), l'ADN des mitochondries et des chloroplastes vient au contraire du noyau, au moins en partie. Pour les auteurs cités ci-dessous, l'ADN mitochondrial se synthétise sur place. En ce qui concerne la chronologie, les résultats obtenus sont de deux sortes: pour certains auteurs (Parsons, 1964, chez *Tetrahymena pyriformis*; Reich et Luck, 1966, chez *Neurospora crassa*; Evans, 1966, et Guttes et al., 1964 et 1967, chez *Physarum polycephalum*), la synthèse de l'ADN mitochondrial intervient pendant tout le cycle cellulaire, tandis que pour d'autres il y a synchronisation des deux synthèses, synchronisation parfaite comme le constatent Steinert et Steinert (1962) pour le kinétoplaste de *Trypanosoma mega*, ou synchronisation partielle comme le constate Cameron (1966) pour les mitochondries de *Tetrahymena pyriformis*.

Cette variété d'opinions nous a paru donner de l'intérêt au problème. Le présent travail a été entrepris pour réétudier par voie radioautographique au microscope électronique les rapports de la synthèse de l'ADN nucléaire avec celle de l'ADN mitochondrial chez *Tetrahymena pyriformis*. Le choix du matériel a été guidé par le fait que, chez ce Cilié, les noyaux (macronoyau et micronoyau) sont de localisation centrale dans la cellule alors que la plupart des mitochondries sont périphériques. Cette disposition favorable élimine tout risque de confusion dans l'interprétation des radioautographies entre la radioactivité nucléaire et la radioactivité mitochondriale, malgré le pouvoir séparateur faible à l'échelle des ultrastructures, de la méthode radioautographique au microscope électronique.

Plusieurs auteurs ont déjà utilisé ce système cellulaire mais, là aussi, les opinions divergent. Pour Parsons (1965) la synthèse d'ADN dans les mitochondries est continue, c'est-à-dire qu'elle n'est pas restreinte aux phases de synthèse nucléaire. A l'opposé, Cameron (1966), tout en reconnaissant que l'ADN mitochondrial se réplique durant la plus grande partie du cycle cellulaire, voit cette réplification augmenter pendant la synthèse de l'ADN micronucléaire.

Enfin, Stone et Miller (1965) adoptent une position intermédiaire en admettant la possibilité d'une telle corrélation, mais sans la démontrer. Ces divergences ont motivé le travail que nous présentons ici.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Tetrahymena pyriformis, (variété I, type conjugant I) est maintenu en culture axénique à 28°C dans un milieu protéose-peptone (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) à la concentration de 1-2% (Plesner et al., 1964). Des repiquages quotidiens nous fournissent des populations en phase logarithmique de croissance dont le temps de doublement est d'environ 6 heures. A de telles cultures, nous ajoutons de la thymidine méthyle-³H d'activité spécifique 9,7 Ci/mm à raison de 200 µ Ci/ml. Après l'addition du précurseur, les tubes de culture sont replacés à 28°C, pour des durées de 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 6 heures, ou 12 heures.

Pour la radioautographie, les Ciliés sont concentrés par centrifugation, fixés à la glutaraldéhyde à 1% dans un tampon phosphate 0,05 M pendant 20 minutes, puis au tétraoxyde d'osmium à 2% dans un tampon identique pendant 1 heure. Ils sont ensuite préinclus dans un caillot de fibrine (Charret et Fauré-Fremiet, 1967). Les préinclusions sont déshydratées et incluses en Epon. La coupe est faite à l'ultratome LKB avec un couteau de diamant en s'attachant à obtenir des séries de coupes d'épaisseur uniforme. Les coupes sont alors traitées pour la radioautographie de haute résolution. Pour cela, elles sont d'abord déposées sur une lame de verre recouverte d'une membrane de celloïdine (Granboulan, 1965), colorées pendant 15-20 minutes à l'acétate d'uranyle alcoolique, puis au citrate de plomb selon Reynolds (1963) pendant 5 minutes. Puis les lames ainsi traitées sont carbonées et recouvertes par trempage d'émulsion Ilford L4. Après une exposition de 5 semaines, les radioautographies sont révélées et fixées. Ensuite, la membrane de celloïdine est décollée du verre par flottage, et les coupes sont recueillies sur des grilles de maille 200. Enfin, la membrane de celloïdine est amincie dans l'acétate d'isoamyle. L'ensemble de cette technique se réfère à celle de Droz (1967).

Pour les digestions enzymatiques, les cellules incubées avec de la thymidine tritiée sont fixées dans du formol à 10% dans un tampon phosphate 0,05 M à 4°C pendant 20 minutes et traitées par la DNase, selon la technique de Swift et al., (1964) pendant 4 heures à 37°C. Les témoins sont incubés dans un milieu identique dépourvu de DNase. Ce traitement est suivi d'une fixation à l'acide osmique à 2% dans un tampon phosphate 0,05 M. Les coupes des cellules ainsi traitées sont radioautographiées comme nous l'avons décrit plus haut.

Les examens des radioautographies au microscope

électronique ont été faits de façon à éviter de photographier plusieurs fois la même section d'une cellule. Dans ce but, nous n'avons observé qu'une seule coupe par grille, en photographiant toutes les sections de Ciliés présentes dans cette coupe. Les grains d'argent ont été dénombrés en ne tenant compte que de ceux qui se trouvent situés en totalité ou en majeure partie au dessus d'un profil de mitochondrie.

Les tests statistiques de comparaison des pourcentages ont été effectués par la méthode du χ^2 de Pearson, le seuil de signification adopté étant le seuil habituel de 5%.

RÉSULTATS

Validité des Radioautographies

Dans les conditions de nos expériences, les grains d'argent se répartissent en presque totalité au dessus des profils de macronoyau, de micronoyau, et de mitochondries (Figs. 1 et 2). Le traitement préalable à la DNase les fait disparaître alors qu'ils sont encore visibles sur le témoin. Ces résultats, attendus, confèrent aux grains d'argent ainsi localisés une très haute significativité vis à vis de l'incorporation du précurseur radioactif dans l'ADN synthétisé pendant le temps de marquage par les trois catégories d'organites précités. Nous avons, en outre, noté la présence de grains d'argent sur quelques cinétosomes (Fig. 2).

Cependant, un petit nombre de grains d'argent n'obéit pas à cette répartition. Les uns se trouvent disséminés au hasard sur toute la surface de la coupe, y compris les espaces extracellulaires; ce sont des grains de fond, sans signification. Nous avons opéré de façon à maintenir leur nombre aussi bas que possible. Ce nombre ne dépasse pas un grain par 100 μ^2 de sorte que l'erreur qu'ils introduisent est négligeable, et nous n'avons pas jugé utile d'en tenir compte en appliquant une correction à nos dénombrements. Les autres se trouvent situés au dessus des profils de vacuoles. On sait que chez *Tetrahymena* en culture axénique, les vacuoles sont nombreuses et volumineuses (Figs. 1, 2, et 8). Ce sont des vacuoles digestives à contenu nutritif très dilué. Le nombre de grains d'argent superposés à ces vacuoles est supérieur au fond. Ces grains représentent sans doute des molécules du traceur en transit vers les lieux d'incorporation, molécules que la fixation et les opérations subséquentes n'auraient pas lavées. Ce marquage parasite n'a pas gêné nos dénombrements de façon sensible, puisque nous n'avons

tenu compte que des grains situés en totalité ou presque au dessus des profils mitochondriaux.

Nos dénombrements concernent les grains d'argent superposés aux mitochondries. Il était donc important que la radioactivité des noyaux, souvent élevée avec les doses que nous avons employées (Figs. 1 et 9), ne provoque pas la formation de grains d'argent sur les mitochondries voisines. Une disposition heureuse fait que, chez *Tetrahymena pyriformis*, il n'y a que très rarement des mitochondries au voisinage des noyaux (Figs. 1, 8, et 9). La majorité des mitochondries est située sous la pellicule, à une distance des noyaux très supérieure au pouvoir séparateur de la méthode radioautographique, et il est fréquent de trouver de très grandes surfaces de coupe dépourvues de noyau mais riches en mitochondries (Fig. 2).

L'Intensité du Marquage des Mitochondries en Fonction du Temps

Afin d'étudier le marquage mitochondrial en fonction du temps, nous avons, pour chaque temps de marquage, compté le nombre de mitochondries radioactives dans une certaine surface de coupe et le nombre total des mitochondries dans la même surface. Les figures 3 à 6 montrent des portions représentatives de ces surfaces pour les temps de 30 minutes, 1 heure, 2 heures, et 6 heures, respectivement. Nous avons ensuite calculé les pourcentages et les intervalles de confiance (Tableau I). Ces résultats, reportés sur un graphique à coordonnées arithmétiques, nous donnent des points grossièrement alignés (Fig. 7). Donc, pour l'intervalle de temps considéré, qui couvre environ deux générations cellulaires, le pourcentage de mitochondries marquées augmente avec le temps de marquage.

L'Intensité du Marquage Mitochondrial en Fonction du Marquage des Noyaux

Le résultat précédent concerne l'ensemble des mitochondries de la population sans tenir compte de l'état du macronoyau ni du micronoyau. C'est donc une sommation des différentes situations du cycle cellulaire. Il est intéressant de rechercher si ce résultat se conserve si l'on ne considère que la fraction de population qui effectue, ou n'effectue pas, la synthèse de son ADN macronucléaire ou micronucléaire.

L'intensité de l'image radioactive des noyaux est variable selon les phases du cycle et permet de

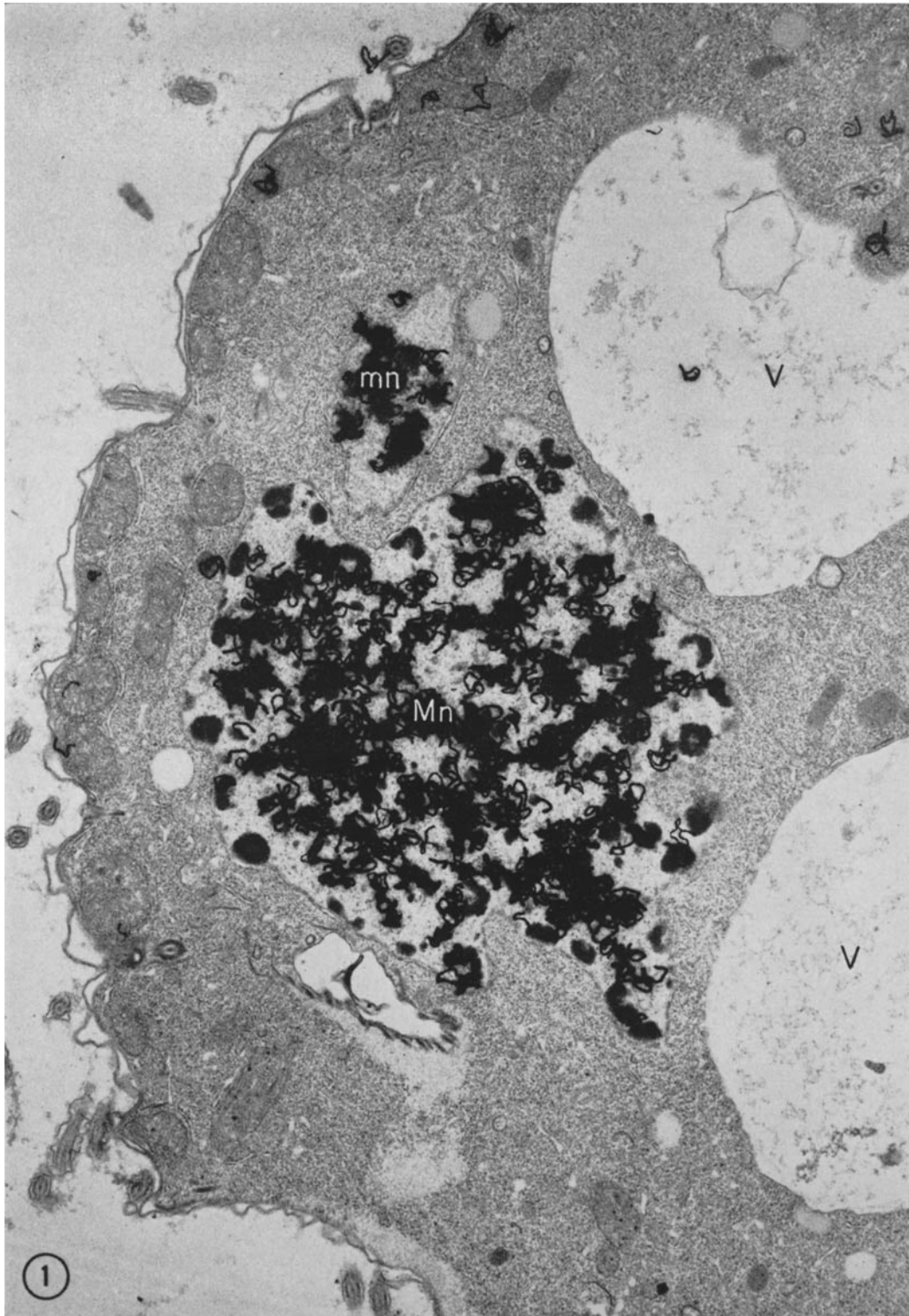


FIGURE 1 Radioautographie montrant le macronoyau (*Mn*) et le micronoyau (*mn*) très fortement marqués. La moitié environ des mitochondries est également marquée. L'intensité du marquage des noyaux et la localisation stricte des grains d'argent au dessus des chromosomes du micronoyau confirmer l'incorporation de la thymidine-³H dans l'ADN. Deux grains d'argent s'observent sur une vacuole (*V*). Marquage de 12 heures, exposition de 5 semaines. $\times 11,200$.

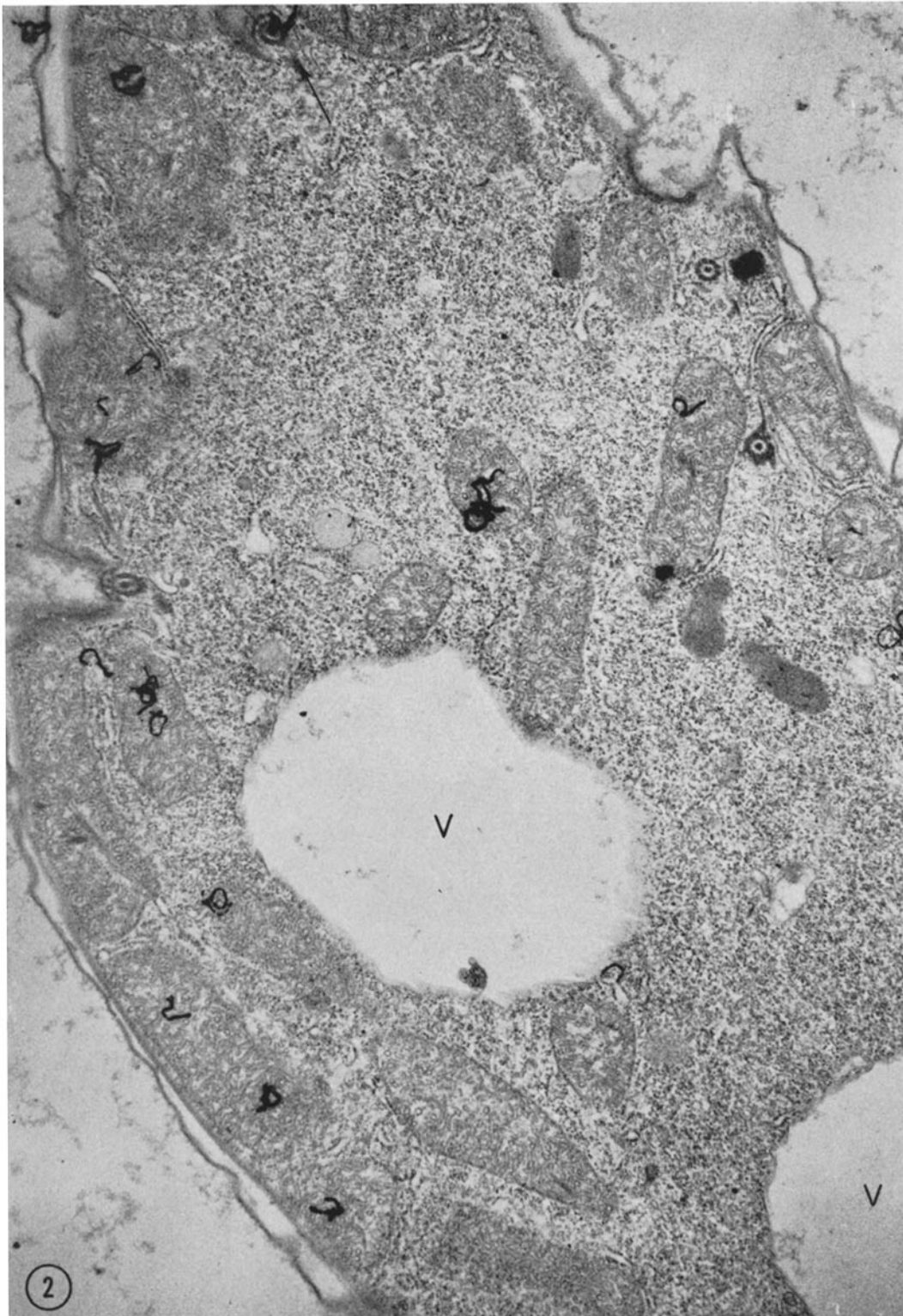
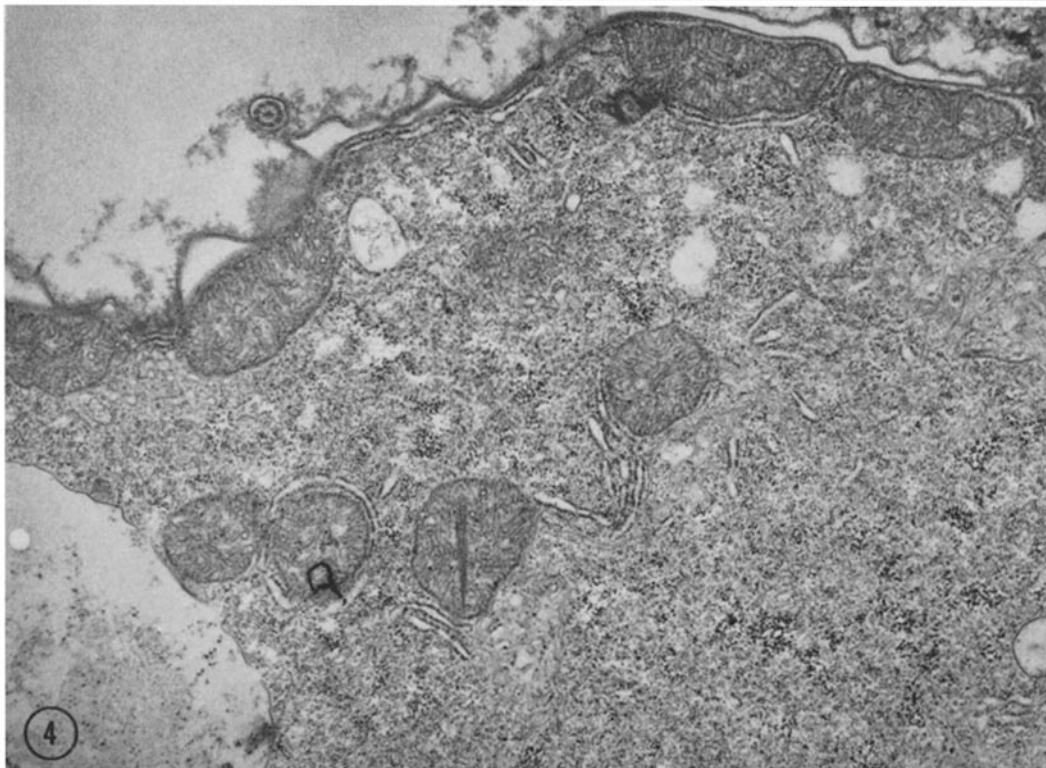
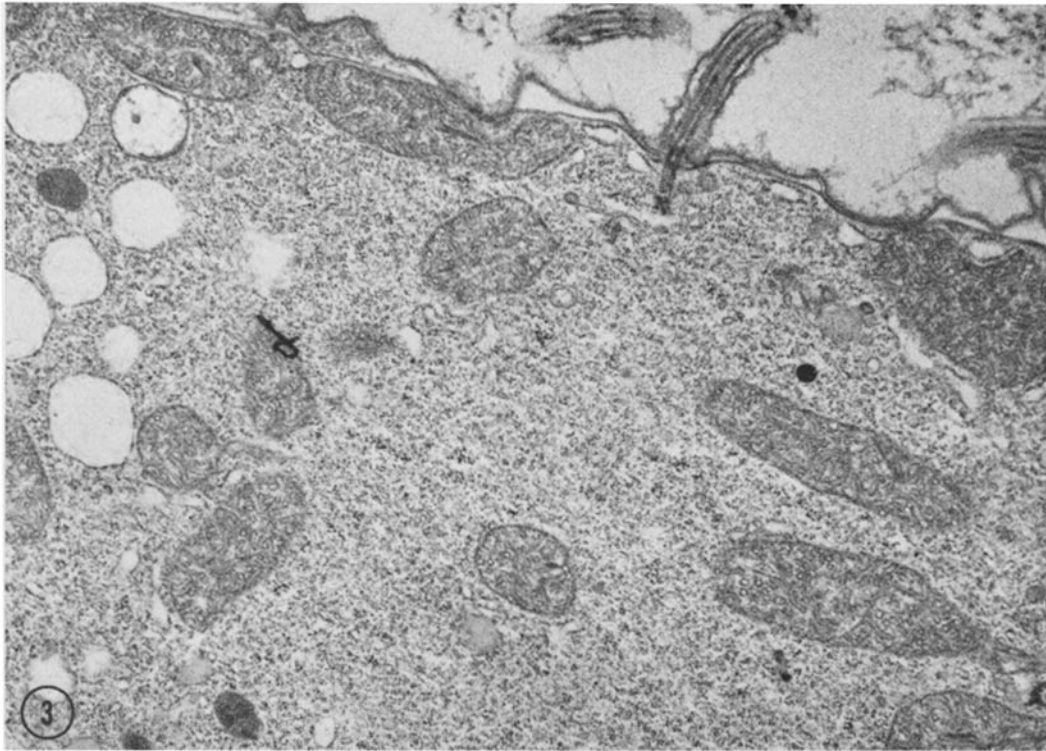
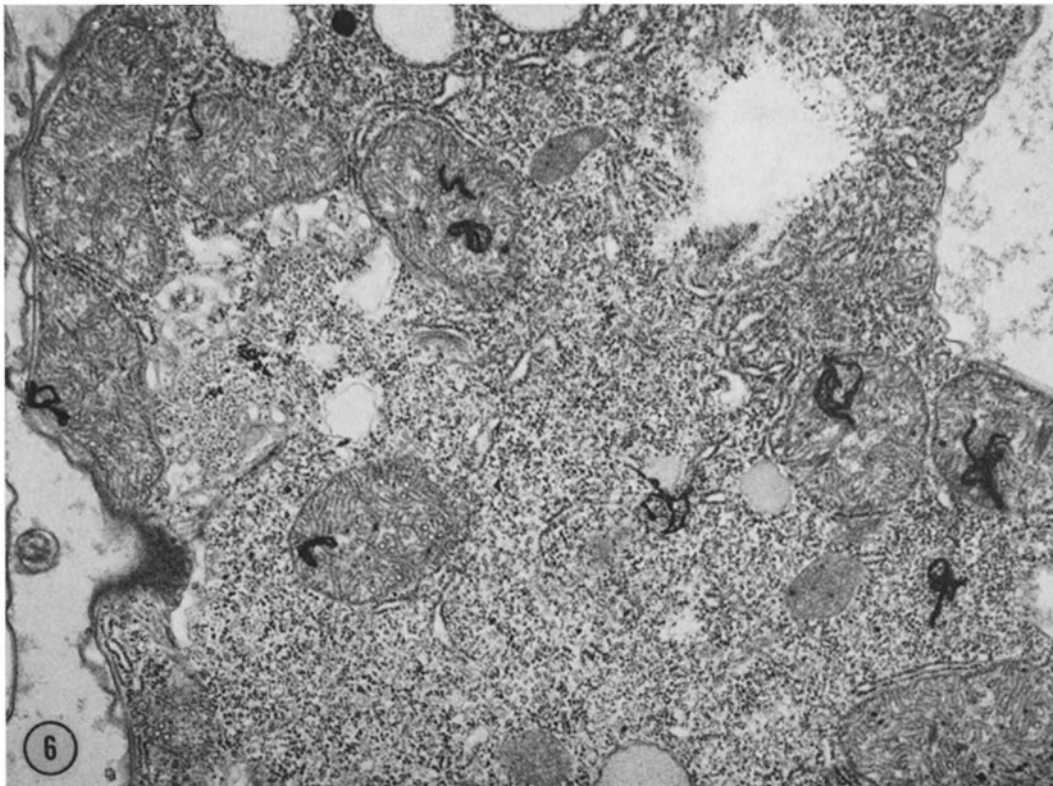
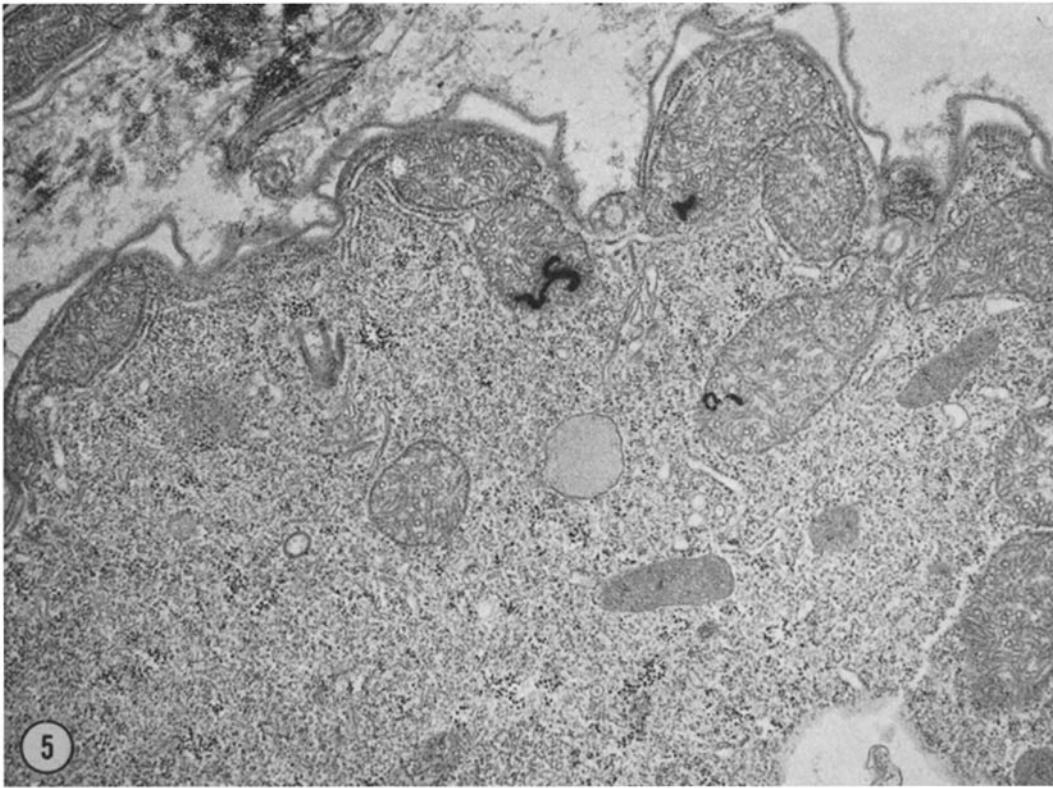


FIGURE 2 Portion de cellule montrant l'incorporation de thymidine-³H par les mitochondries. La plupart des grains d'argent sont sur les profils mitochondriaux. Un grain se remarque sur un cinétosome (flèche). Vacuole (V). Marquage de 6 heures, exposition de 5 semaines. $\times 17,400$.



FIGURES 3-6 Intensité de la radioactivité mitochondriale par rapport au temps de marquage. Les temps de marquage sont successivement 15 minutes (Fig. 3), 1 heure (Fig. 4), 2 heures (Fig. 5), et 6 heures (Fig. 6). Exposition uniforme de 5 semaines. On voit que le nombre de mitochondries marquées par rapport au nombre total de mitochondries augmente avec le temps de marquage: on trouve 8% (Fig. 3), 11% (Fig. 4), 30% (Fig. 5), et 66% (Fig. 6). $\times 20,000$.



FIGURES 5 et 6 Voir légende sous Figs. 3 et 4. $\times 20,000$.

TABLEAU I
Marquage Mitochondrial en Fonction du Temps

Temps	¼ h	½ h	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h
Nombre de mitochondries radioactives	9	12	49	141	159	242	363
Nombre total de mitochondries	567	539	859	1426	1144	816	860
Pourcentage et écart-type*	1.6±1.0	2.2±1.2	5.7±1.4	9.8±1.5	13.8±2.0	29.6±3.1	42.2±3.3

Intensité du marquage des mitochondries exprimée en pourcentage de mitochondries radioactives, pour des durées allant de 15 minutes à 12 heures.

* L'écart-type a été calculé selon la formule habituelle $\sqrt{\frac{pq}{n}}$

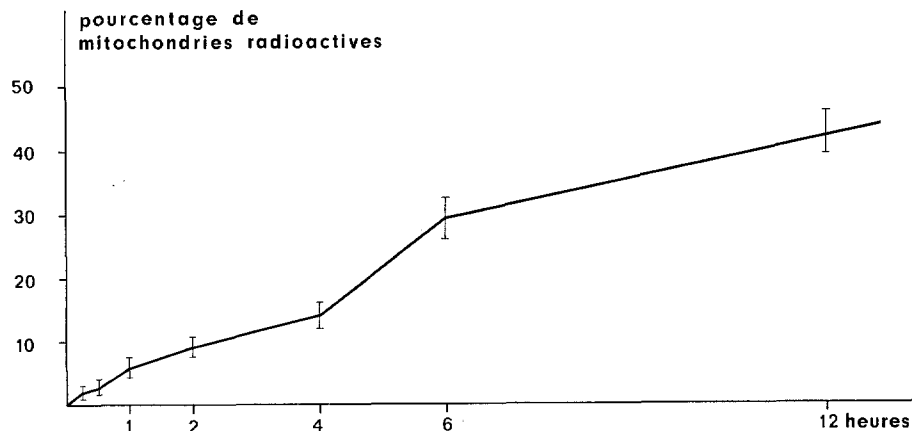


FIGURE 7 Représentation graphique de l'intensité du marquage des mitochondries en fonction du temps.

distinguer les noyaux peu ou pas marqués, en phase G₁ ou G₂ (Figs. 8 et 9) des noyaux marqués ou fortement marqués, en phase S (Figs. 1 et 9).

CAS DES NOYAUX NON MARQUÉS: Pour les temps de marquage courts, on trouve assez fréquemment des noyaux non marqués. Dans ce cas, on trouve néanmoins un marquage mitochondrial, dont l'intensité est fonction du temps, conformément à ce que l'on a vu au Tableau I et sur la figure 7. Les figures 8 et 9 donnent des exemples de mitochondries marquées dans des cellules où le macronoyau (Fig. 8) ou le micronoyau (Fig. 9) ne le sont pas. Il en est de même dans les figures où l'on voit les deux noyaux simultanément non marqués. Il n'y a donc pas, dans le marquage mitochondrial, de discontinuité synchronisée avec celle du marquage des noyaux.

CAS DU MACRONOYAU MARQUÉ: Nous avons

cherché à reconnaître s'il existe une différence dans l'intensité du marquage mitochondrial entre les cellules dans lesquelles le macronoyau est marqué et celles où il ne l'est pas. Les nombres obtenus sont rassemblés dans le Tableau II. Nous avons éliminé les marquages de 15 minutes pour lesquels le marquage des mitochondries est très faible (Tableau I), et les marquages de 4 heures et davantage, pour lesquels le non marquage macronucléaire est impossible, le temps de génération étant d'environ 6 heures et la phase S d'environ 2 heures. Les deux pourcentages obtenus pour chaque temps sont comparés. Les différences sont, dans tous les cas, non significatives au seuil habituel de 5%. Il y a donc identité dans le marquage mitochondrial, que le macronoyau soit, ou non, en phase S.

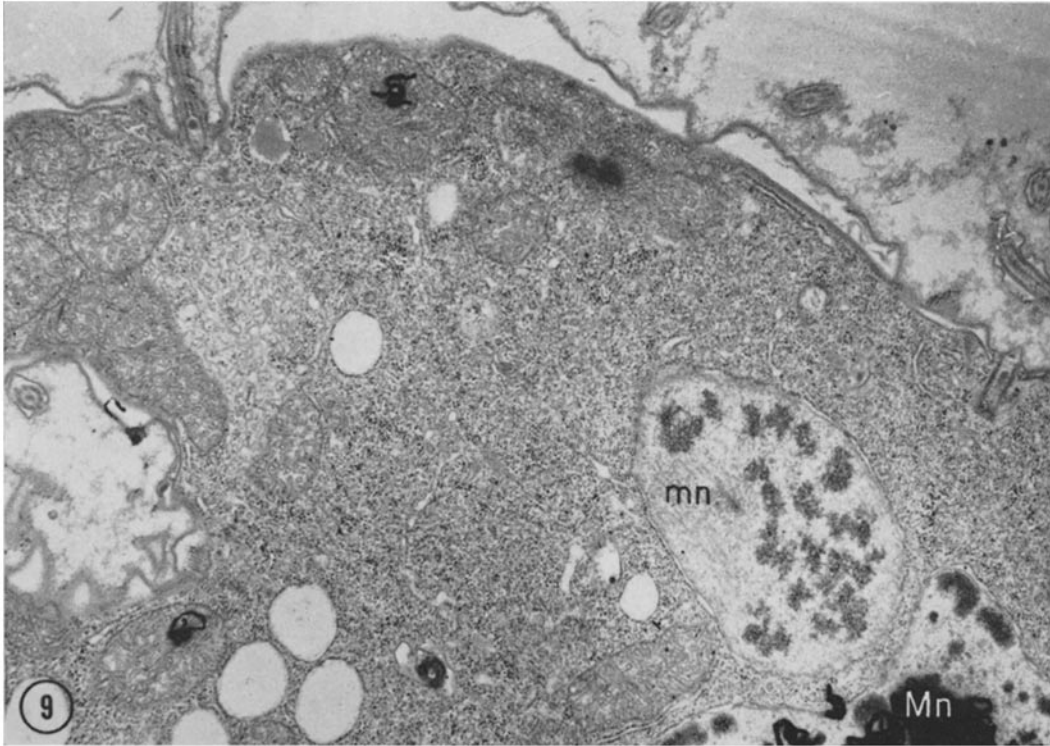
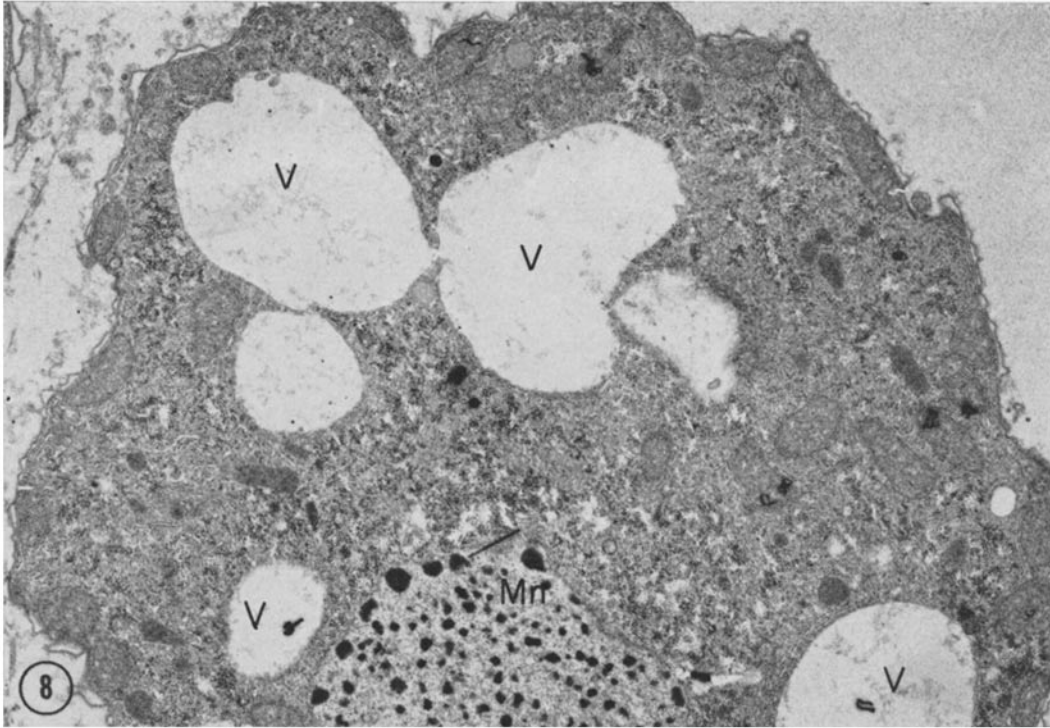


FIGURE 8 Dans cette cellule, certaines mitochondries sont marquées bien que le macronoyau (*Mn*) ne le soit pas (phase G_1 ou G_2). Vacuole (*V*). Marquage de 2 heures, exposition de 5 semaines. $\times 7500$.

FIGURE 9 Deux mitochondries sont marquées alors que le micronoyau (*mn*) en fin de phase G_2 ne l'est pas. Le macronoyau (*Mn*) est en phase S. Marquage de 4 heures, exposition de 5 semaines. $\times 14,400$.

DISCUSSION

Spécificité du Marquage par la Thymidine Tritiée

L'existence d'ADN cytoplasmique chez *Tetrahymena pyriformis* est signalée en 1960 par Scherbaum. Puis Parsons (1964), ainsi que Stone et Prescott (1964) localisent cet ADN dans les mitochondries en montrant que ces organites incorporent la thymidine tritiée.

Mais certains auteurs (Albach, 1967) ont émis l'objection que, chez *Tetrahymena* en croissance rapide, la thymidine-³H n'est pas incorporée uniquement dans l'ADN. Cependant, nos images de noyaux dans lesquels le marquage nucléaire est intense (Fig. 1) indiquent que la quasi totalité de la thymidine est incorporée dans la chromatine. Nos images de micronoyaux en mitose montrent d'autre part une stricte localisation de la radioactivité dans les chromosomes. L'observation de grains d'argent dans les vacuoles digestives (Figs. 1 et 8) suggère la présence de thymidine en cours d'ingestion non éliminée lors des opérations qui suivent la fixation. Les grains vus sur les cinétosomes, signalent probablement la présence d'ADN au niveau des corpuscules basaux, ce qui confirme les observations de Randall et Disbrey (1965).

Ces divers faits, ajoutés à l'action de la DNase, font que l'on peut considérer sans erreur importante les grains d'argent superposés aux mitochondries comme dénotant de l'ADN synthétisé pendant la durée de l'expérience.

L'Origine de l'ADN Mitochondrial

Nous avons montré que *Tetrahymena pyriformis* en phase logarithmique de croissance incorpore la thymidine tritiée dans ses mitochondries pendant tout le cycle cellulaire et en particulier pendant les phases de non synthèse de l'ADN nucléaire. Ce résultat est conforme à celui de Parsons (1965) sur le même matériel, de Guttes et al. (1964 et 1967), Evans (1966) sur *Physarum polycephalum*, de Reich et Luck (1966) sur *Neurospora crassa*, de Chiang et Sueoka (1967) sur *Chlamydomonas*, et de Meyer et Ris (1966) sur des cultures de tissus. Ces résultats convergents indiquent clairement que la synthèse de l'ADN mitochondrial se fait sur place, et rend très improbable l'interprétation de Bell et Mühlethaler d'une cession d'ADN par le noyau aux mitochondries.

Nous avons montré d'autre part que la radio-

activité de l'ensemble du chondriome d'une cellule augmente régulièrement, sans variation brusque, en raison directe du temps. On sait par contre, que les phases de synthèse de l'ADN du macronoyau comme du micronoyau sont des phénomènes brusques qui ont lieu à des périodes différentes au cours du cycle cellulaire (McDonald, 1962). La double indépendance cinétique de la synthèse de l'ADN mitochondrial vis à vis des synthèses nucléaires rend improbable, dans notre système cellulaire, le transport d'ADN des mitochondries vers le noyau, ainsi que le pensent Chèvremont et ses collaborateurs pour des cellules en culture.

Ainsi, nos résultats tendent à montrer que l'ADN des mitochondries de *Tetrahymena pyriformis* est proprement mitochondrial, qu'il se réplique sur place de façon autonome, indépendamment du noyau. Cependant, il est évident qu'un système de régulation accorde la vitesse de la synthèse de l'ADN du chondriome avec celle de l'ADN des noyaux de façon à maintenir constant, au long des générations cellulaires, le nombre des mitochondries par cellule et le rapport volume du chondriome sur volume des noyaux. Certaines conditions trophiques peuvent détruire momentanément cet équilibre (Moustacchi et Williamson, 1966) mais, à longue échéance, la lignée cellulaire ne peut se maintenir que s'il se rétablit.

La Continuité de la Synthèse d'ADN par les Mitochondries

Les résultats donnés par les Tableaux II et III sont en contradiction avec ceux de Cameron (1966) qui note une augmentation de la radioactivité des mitochondries pendant la phase S micronucléaire et de Stone et Miller (1965) qui estiment qu'il existe une corrélation entre la phase de synthèse de l'ADN nucléaire et celle de l'ADN mitochondrial. La contradiction vient sans doute du fait que ces auteurs utilisent des cultures en phase stationnaire qu'ils enrichissent en milieu frais en même temps qu'ils ajoutent le précurseur radioactif. Ils déclenchent ainsi une synthèse généralisée d'ADN à la fois dans les noyaux et les mitochondries, de sorte que la corrélation qu'ils observent est provoquée par les conditions trophiques. Nous pensons que le système que nous avons employé (cultures régulièrement entretenues en phase logarithmique), dans lequel l'addition du précurseur ne s'accompagne d'aucun choc trophique, est plus proche de la physiologie

TABLEAU II
Marquage Mitochondrial en Fonction du Marquage Macronucléaire

Temps	½ h		1 h		2 h	
	Non marqué	Marqué	Non marqué	Marqué	Non marqué	Marqué
Macronoyau						
Nombre de mitochondries radioactives	2	2	16	5	25	27
Nombre total de mitochondries	103	143	337	82	238	294
Pourcentage	1.9	1.4	4.7	6.1	10.5	9.1
Comparaison des pourcentages	Non sign.*		Non sign.		Non sign.	

TABLEAUX II et III Marquage mitochondrial en fonction du marquage des noyaux. (Tableau II, macronoyau; Tableau III, micronoyau.) On a comparé, pour chaque temps de marquage, le pourcentage des mitochondries radioactives dans le cas du noyau non marqué avec celui du noyau marqué. Les tests de comparaison des pourcentages ont été effectués par la méthode classique du χ^2 de Pearson, le seuil de signification adopté étant le seuil habituel de 5%.

* Non sign. : différence non significative.

TABLEAU III
Marquage Mitochondrial en Fonction du Marquage Micronucléaire

Temps	½ h		1 h		2 h		4 h	
	Non marqué	Marqué	Non marqué	Marqué	Non marqué	Marqué	Non marqué	Marqué
Micronoyau								
Nombre de mitochondries radioactives	1	3	11	12	11	23	7	7
Nombre total de mitochondries	20	180	269	293	93	217	83	114
Pourcentage	5.0	1.7	4.1	4.0	11.8	10.5	9.6	6.0
Comparaison des pourcentages	Non sign.*		Non sign.		Non sign.		Non sign.	

Voir légende sous Tableau II.

* Non sign. : différence non significative.

normale des cellules et qu'il perturbe moins les phases de synthèse de l'ADN.

Notre résultat s'oppose de même aux observations faites par Bronchart et al. (1966) sur des cellules méristématiques de *Sinapis* pour lesquelles ils mettent en évidence une synchronisation de la synthèse de l'ADN des mitochondries et de l'ADN nucléaire. De même, Steinert et Steinert (1962) démontrent chez *Trypanosoma mega* une synchronisation de la synthèse de l'ADN du noyau et de celle de l'ADN du kinétoplaste. Cette dernière différence est intéressante. Le kinétoplaste des Trypanosomidés peut être considéré comme l'unique mitochondrie à ADN de la cellule. On peut penser que l'évolution n'aurait pas conservé la lignée si noyau et kinétoplaste n'étaient pas préparés ensemble à effectuer leur division. Quoique n'étant pas la seule manière d'y parvenir,

le synchronisme de la réplication des deux stocks d'ADN assure parfaitement ce résultat. La situation est différente chez *Tetrahymena* où une population d'environ 700 mitochondries assure beaucoup plus facilement l'héritage des cellules-filles en mitochondries. La cytodierèse donne à chaque cellule-fille plusieurs centaines de mitochondries dont chacune possède son propre stock d'ADN. Il n'apparaît pas comme évolutivement important que les cycles de réplication de l'ADN des différentes mitochondries soient synchrones ni qu'ils soient accordés avec ceux des noyaux.

Nous devons d'ailleurs souligner le fait que la continuité de synthèse que nous avons mise en évidence n'est valable que pour le chondriome pris dans son ensemble. Il nous est impossible d'examiner une mitochondrie individuellement, et nous ne pouvons déterminer si la continuité que nous observons n'est qu'une sommation de

discontinuités asynchrones, ou si chaque mitochondrie a réellement une synthèse continue d'ADN, sans phase de repos, à la façon des bactéries en croissance rapide.

Nous tenons à remercier MM. B. Droz et P. Granboulan de nous avoir initiés à la technique radioautographique et M. P. Lazar pour l'aide apportée dans l'interprétation statistique des résultats; M. B. Droz nous a utilement conseillés pendant la rédaction de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBACH, R. A. 1967. Incorporation of tritium from thymidine-methyl- H^3 into DNA, RNA, lipids and protein in logarithmic and stationary phase *Tetrahymena pyriformis*, Strain W. *J. Protozool.* 14:271.
- BELL, P. R., and K. MÜHLETHALER. 1964. Evidence for the presence of deoxyribonucleic acid in the organelles of the egg cells of *Pteridium aquilinum*. *J. Mol. Biol.* 8:853.
- BISALPUTRA, T., and A. A. BISALPUTRA. 1967. Chloroplast and mitochondrial DNA in a brown alga *Egregia menziesii*. *J. Cell Biol.* 33:511.
- BORST, P., A. M. KROON, and G. J. C. M. RUTTENBERG. 1967 a. Mitochondrial DNA and other forms of cytoplasmic DNA. In Genetic Elements Properties and Function. D. Shugar, editor. Academic Press Inc., New York. 81-115.
- BORST, P., G. J. C. M. RUTTENBERG, and A. M. KROON. 1967 b. Mitochondrial DNA. I. Preparation and properties of mitochondrial DNA from chick liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 149:140.
- BORST, P., E. F. J. VAN BRUGGEN, G. J. C. M. RUTTENBERG, and A. M. KROON. 1967 c. Mitochondrial DNA. II-Sedimentation analysis and electron microscopy of mitochondrial DNA from chick liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 149:156.
- BRONCHART, R., G. BERNIER, and W. A. JENSEN. 1966. Localisation par autoradiographie au microscope électronique des lieux de synthèse du DNA dans les cellules méristématiques de *Sinapis alba* L. (Crucifères). *J. Microscopie.* 5:36a.
- CAMERON, I. L. 1966. A periodicity of tritiated-thymidine incorporation into cytoplasmic deoxyribonucleic acid during the cell cycle of *Tetrahymena pyriformis*. *Nature.* 209:630.
- CHARRET, R., and E. FAURÉ-FREMIET. 1967. Technique de rassemblement de microorganismes: préinclusion dans un caillot de fibrine. *J. Microscopie.* 6:1063.
- CHÈVREMONT, M. 1963. Cytoplasmic deoxyribonucleic acids: their mitochondrial localization and synthesis in somatic cells under experimental conditions and during the normal cell cycle in relation to the preparation for mitosis. In Cell Growth and Cell Division. R. J. E. Harris, editor. Academic Press Inc., New York. 2:323-333.
- CHÈVREMONT, M. 1965. Metabolism and synthesis of DNA studied by autohistoradiography in animal cells under normal and experimental conditions. In Isotopes in Experimental Pharmacology. L. J. Roth, editor. University of Chicago Press, Chicago, Ill. 117-132.
- CHÈVREMONT, M., R. BASSLEER, and E. BAECKELAND. 1961. Nouvelles recherches sur les acides désoxyribonucléiques dans des cultures de fibroblastes refroidies puis réchauffées. Etude cytophotométrique et histoautoradiographique. Localisation cytoplasmique d'ADN. *Arch. Biol.* 72:501.
- CHIANG, K. S., and N. SUEOKA. 1967. Replication of chloroplast DNA in *Chlamydomonas reinhardtii* during vegetative cell cycle: its mode and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 57:1506.
- DAWID, I. B., and D. R. WOLSTENHOLME. 1967. Ultracentrifuge and electron microscope studies on the structure of mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 28:233.
- DROZ, B. 1967. Synthèse et transfert des protéines cellulaires dans les neurones ganglionnaires. Etude radioautographique quantitative en microscopie électronique. *J. Microscopie.* 6:201.
- EVANS, T. E. 1966. Synthesis of a cytoplasmic DNA during the G2 interphase of *Physarum polycephalum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22:678.
- GRANBOULAN, P. 1965. Comparison of emulsions and techniques in electron microscope radioautography. In The Use of Radioautography in Investigating Protein Synthesis. C. P. Leblond and K. B. Warren, editors. Academic Press Inc., New York. 43-63.
- GRANICK, S., and A. GIBOR. 1967. The DNA of chloroplasts, mitochondria, and centrioles. In Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. J. N. Davidson and W. E. Cohn, editors. Academic Press Inc., New York. 143-186.
- GUTTES, E. W., and S. GUTTES. 1964. Thymidine incorporation by mitochondria in *Physarum polycephalum*. *Science.* 145:1057.

Received for publication 7 March 1968, and in revised form 6 July 1968.

- GUTTES, E. W., P. C. HANAWALT, and S. GUTTES. 1967. Mitochondrial DNA synthesis and the mitotic cycle in *Physarum polycephalum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **142**:181.
- HOFF-JØRGENSEN, E., and E. ZEUTHEN. 1952. Evidence of cytoplasmic deoxyribosides in the frog's egg. *Nature.* **169**:245.
- KISLEV, N., H. SWIFT, and L. BOGORAD. 1965. Nucleic acids of chloroplasts and mitochondria in Swiss chard. *J. Cell Biol.* **25**:327.
- KROON, A. M. 1966. Protein synthesis in mitochondria. M. D. Thesis. Amsterdam, Drukkerij Noordholland, Hoorn.
- LUCK, D. J. L., and E. REICH. 1964. DNA in mitochondria of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **52**:931.
- MCDONALD, B. B. 1962. Synthesis of deoxyribonucleic acid by micro- and macronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* **13**:193.
- MEYER, R. R., and H. RIS. 1966. Incorporation of tritiated thymidine and tritiated deoxyadenosine into mitochondrial DNA of chick fibroblasts. *J. Cell Biol.* **31**:76A.
- MOUNOULOU, J. C. 1967. Role d'un ADN spécifique dans le déterminisme génétique et physiologique des mitochondries de la levure. Thèse. Université de Paris.
- MOUSTACCHI, E., and D. H. WILLIAMSON. 1966. Physiological variations in satellite components of Yeast DNA, detected by density gradient centrifugation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**:56.
- NASS, M. M. K. 1966. The circularity of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **56**:1215.
- NASS, S., and M. M. K. NASS. 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J. Cell Biol.* **19**:593.
- NASS, M. M. K., S. NASS, and B. A. AFZELIUS. 1965. The general occurrence of mitochondrial DNA. *Exptl. Cell Res.* **37**:516.
- PARSONS, J. A. 1964. The division of mitochondrial DNA in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* **23**:70A.
- PARSONS, J. A. 1965. Mitochondrial incorporation of tritiated thymidine in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* **25**:641.
- PIKÓ, L., A. TYLER, and J. VINOGRAD. 1967. Amount, location, priming capacity, circularity and other properties of cytoplasmic DNA in sea urchin eggs. *Biol. Bull.* **132**:68.
- PLESNER, P., L. RASMUSSEN, and E. ZEUTHEN. 1964. Techniques used in the study of synchronous *Tetrahymena*. In *Synchrony in Cell Division and Growth*. E. Zeuthen, editor. Interscience Publishers Inc., New York. 543-563.
- RANDALL, J., and C. DISBREY. 1965. Evidence for the presence of DNA at basal body sites in *Tetrahymena pyriformis*. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.* **162**:473.
- REICH, E., and D. J. L. LUCK. 1966. Replication and inheritance of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **55**:1600.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**:208.
- RIS, H., and W. PLAUT. 1962. Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* **13**:383.
- SCHERBAUM, O. H. 1960. Possible sites of metabolic control dividing during the induction of synchronous cell division. *Ann. Acad. Sci. N. Y.* **90**:565.
- SCHUSTER, F. L. 1965. A deoxyribose nucleic acid component in mitochondria of *Didymium nigripes*, a slime mold. *Exptl. Cell Res.* **39**:329.
- SINCLAIR, J. H. 1966. Mitochondrial DNA and other low molecular weight cellular DNA's. Ph.D. Thesis. University of Chicago, Chicago, Illinois.
- SINCLAIR, J. H., and B. J. STEVENS. 1966. Circular DNA filaments from mouse mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **56**:508.
- STEINERT, M. 1960. Mitochondria associated with the kinetosome of *Trypanosoma mega*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **8**:542.
- STEINERT, M. 1965. L'absence d'histones dans le kinétonucleus des Trypanosomes. *Exptl. Cell Res.* **39**:69.
- STEINERT, M., and G. STEINERT. 1962. La synthèse de l'ADN au cours du cycle de division de *Trypanosoma mega*. *J. Protozool.* **9**:203.
- STONE, G. E., and O. L. MILLER, JR. 1965. A stable mitochondrial DNA in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Exptl. Zool.* **159**:33.
- STONE, G. E., and D. M. PRESCOTT. 1964. Cytoplasmic DNA in *Tetrahymena*. *J. Protozool. Suppl.* **11**:24.
- SUYAMA, Y., and J. R. PREER, JR. 1965. Mitochondrial DNA from Protozoa. *Genetics.* **52**:1051.
- SWIFT, H., B. J. ADAMS, and K. LARSEN. 1964. Electron microscope cytochemistry of nucleic acids in *Drosophila* salivary glands and *Tetrahymena*. *J. Roy. Microscop. Soc.* **83**:161.
- VAN BRUGGEN, E. F. J., P. BORST, G. J. C. M. RUTTENBERG, M. GRUBER, and A. M. KROON. 1966. Circular mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* **119**:437.