

50376
1984
217

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

N° d'ordre : 359

THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR INGÉNIEUR
EN BIOCHIMIE**

par

Marie-Noëlle FOURMAUX-PRIEM

TETRAHYMENA PYRIFORMIS SYNCHRONE :

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DE PROTÉINES ENZYMATIQUES A L'AIDE D'INHIBITEURS SPÉCIFIQUES

Soutenue le 7 DÉCEMBRE 1984 devant la Commission d'Examen

Président : Professeur J. MONTREUIL
Rapporteur : Docteur D. DIVE
Examineurs : Professeur J. KREMBEL
Professeur H. LECLERC
Professeur B. VANDORPE
Docteur F. STROWZYK

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOSQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRUYELLE Pierre
M. CAPURON Alfred
M. CARREZ Christian
M. CAYATTE Jean-Louis
M. CHAPOTON Alain
M. COQUERY Jean-Marie
Mme CORSIN Paule
M. CORTOIS Jean
M. COUTURIER Daniel
M. CROSNIER Yves
M. CURGY Jean-Jacques
Mlle DACHARRY Monique
M. DAUCHET Max
M. DEBRABANT Pierre
M. DEGAUQUE Pierre
M. DELORME Pierre
M. DELORME Robert
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine
M. DEMUNTER Paul
M. DENEL Jacques
M. DE PARIS Jean-Claude
Mlle DESSAUX Odile
M. DEVRAINNE Pierre
M. DHAINAUT André
Mme DHAINAUT Nicole
M. DORMARD Serge
M. DOUKHAN Jean-Claude
M. DUBOIS Henri
M. DUBRULLE Alain
M. DUBUS Jean-Paul
M. DUPONT Christophe
M. FAKIR Sabah
M. FONTAINE Hubert
M. FOUQUART Yves
M. FRONTIER Serge
M. GAMBLIN André
M. GLORIEUX Pierre

M. GOBLOT Rémi
M. GOSSELIN Gabriel
M. GOUDMAND Pierre
M. GREGORY Pierre
M. GREMY Jean-Paul
M. GREVET Patrick
M. GUILBAULT Pierre
M. HENRY Jean-Pierre
M. HERMAN Maurice
M. JACOB Gérard
M. JACOB Pierre
M. JACQUILLAT Bertrand
M. JEAN Raymond
M. JOFFRE Patrick
M. JOURNAL Gérard

Géographie
Biologie animale
Informatique
Sciences économiques
Electronique
Psychophysiologie
Paléontologie
Physique nucléaire et corpusculaire
Chimie organique
Electronique
Biologie
Géographie
Informatique
Géologie appliquée
Electronique
Physiologie animale
Sciences économiques
Sciences économiques
Sociologie
Informatique
Analyse
Spectroscopie de la réactivité chimique
Chimie minérale
Biologie animale
Biologie animale
Sciences économiques
Physique du solide
Spectroscopie hertzienne
Spectroscopie hertzienne
Spectrométrie des solides
Vie de la firme (I.P.A.)
Algèbre
Dynamique des cristaux
Optique atmosphérique
Ecologie numérique
Géographie urbaine, industrielle et démographi-
riques
Algèbre
Sociologie
Chimie physique
I.P.A.
Sociologie
Sciences économiques
Physiologie animale
Génie mécanique
Physique spatiale
Informatique
Probabilités et statistiques
Gestion
Biologie des populations végétales
Vie de la firme (I.P.A.)
Spectroscopie hertzienne

M. KREMBEL Jean
M. LANGRAND Claude
M. LATTEUX Michel
Mme LECLERCQ Ginette
M. LEFEVRE Christian
Mlle LEGRAND Denise
Mlle LEGRAND Solange
Mme LEHMANN Josiane
M. LEMAIRE Jean
M. LE MAROIS Henri
M. LHENAFF René
M. LOCQUENEUX Robert
M. LOSFELD Joseph
M. LOUAGE Francis
M. MACKE Bruno

M. MAIZIERES Christian
M. MESSELYN Jean
M. MESSERLIN Patrick
M. MONTEL Marc
Mme MOUNIER Yvonne
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine
M. PARSY Fernand
M. PASZKOWSKI Stéphan
Mlle PAUPARDIN Colette
M. PERROT Pierre
M. PERTUZON Emile
M. PONSOLLE Louis
M. PORCHET Maurice
M. POVY Lucien
M. RACZY Ladislas
M. RAOULT Jean-François
M. RICHARD Alain
M. RIETSCH François
M. ROBINET Jean-Claude
M. ROGALSKI Marc
M. ROY Jean-Claude
M. SCHAMPS Joël
Mme SCHWARZBACH Yvette
M. SLIWA Henri
M. SOMME Jean
Mlle SPIK Geneviève
M. STAROSWIECKI Marcel
M. STERBOUL François
M. TAILLIEZ Roger
Mme TJOTTA Jacqueline
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TUREL Georges
M. VANDORPE Bernard
M. VAST Pierre
M. VERBERT André
M. VERNET Philippe
M. WALLART Francis
M. WARTEL Michel
M. WATERLOT Michel
Mme ZINN Justin Nicole

Biochimie
Probabilités et statistiques
Informatique
Catalyse
Pétrologie
Algèbre
Algèbre
Analyse
Spectroscopie hertzienne
Vie de la firme (I.P.A.)
Géographie
Physique théorique
Informatique
Electronique
Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques

Automatique
Physique atomique et moléculaire
Sciences économiques
Physique du solide
Physiologie des structures contractiles
Géographie
Mécanique
Analyse numérique
Biologie physiologie végétales
Chimie appliquée
Physiologie animale
Chimie physique
Biologie animale
Automatique
Electronique
Géologie structurale
Biologie animale
Physique des polymères
E.U.D.I.L.
Analyse
Psychophysiologie
Spectroscopie moléculaire
Géométrie
Chimie organique
Géographie
Biochimie
Informatique
Informatique
Génie alimentaire
Mathématiques
Automatique
Spectrochimie infrarouge et Raman
Chimie minérale
Chimie inorganique
Biochimie
Génétiq ue
Spectrochimie infrarouge et Raman
Chimie inorganique
Géologie générale
Algèbre

A mon père, trop tôt disparu

A ma mère

A mon mari

A ma fille

A l'enfant que je porte

Avec tout mon amour

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire d'Ecotoxicologie Microbienne de l'unité I.N.S.E.R.M. 146, sous la direction de Monsieur le Professeur H. LECLERC. Ses conseils judicieux, ses encouragements, les moyens qu'il a toujours mis à ma disposition ont permis la réalisation de ce travail. Le moment est venu de lui exprimer ma gratitude et mon profond respect.

Je remercie Monsieur le Docteur D. DIVE, Chargé de Recherche à l'I.N.S.E.R.M.; de la confiance qu'il m'a accordée en me confiant ce travail. Il m'a fait profiter de sa grande expérience scientifique, ses conseils et ses encouragements ont permis la réalisation de cette thèse. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur J. MONTREUIL de l'honneur qu'il me fait en présidant ce jury. Je le prie de croire en ma respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur J. KREMBEL, Monsieur le Professeur B. VANDORPE, Monsieur le Docteur F. STROZYK, j'adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Messieurs CACAN, S. CONJEVARAAN, J.F. DUBREMETS, P. MAUROY et R. PERASSO, pour les conseils judicieux et les discussions fructueuses qu'ils m'ont apportés au cours de ce travail, j'exprime mes plus vifs remerciements.

Je remercie aussi C. BEL, P. BOUVEUR, E. DEWAILLY et A. FOURMENT pour leur aide lors de la réalisation des dessins et des diapositives. Qu'ils soient assurés de ma profonde sympathie.

La dactylographie a été effectuée avec soin et célérité par Madame C. DECHY, je tiens ici à lui exprimer tous mes remerciements.

Enfin, que tous ceux qui m'ont encouragée et aidée dans la réalisation de ce travail soient assurés de ma reconnaissance et de mon amitié.

Les résultats inclus dans la thèse font l'objet des publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS (abstracts)

- MEREAU M., FOURMAUX M.N., DIVE D.
Synchronous *Tetrahymena* as a toxicological tool
"Effect of thiram on fine structure and two mitochondrial enzyme activities."
J. Protozool., 29 (2), p 308, 1982

- FOURMAUX M.N., DIVE D.
"Données nouvelles sur l'isocitrate déshydrogénase à NADP chez *Tetrahymena*."
J. Protozool., 30 (3), p 68A, 1983

COMMUNICATIONS

- MEREAU M., FOURMAUX M.N., SLIMANE M., DIVE D.
"Toxicité aigüe du thirame vis-à-vis de *Tetrahymena pyriformis* GL."
Congrès des protistologues de langue française, Toulouse, Mai 1982

- FOURMAUX M.N., DIVE D.
"Evolution de l'activité de trois enzymes au cours du cycle synchrone de *Tetrahymena pyriformis* GL."
Congrès des protistologues de langue française, Toulouse, Mai 1982

- DIVE D., MEREAU M., FOURMAUX M.N., SLIMANE M.
"The use of synchronous cultures of *Tetrahymena* as a toxicological tool : a study with the fungicide thiram."
5th European Conference on ciliate biologie, Genève, Septembre 1983

- FOURMAUX M.N., DIVE D.
"*Tetrahymena* : synchronisation et synthèses de protéines enzymatiques."
Congrès des protistologues de langue française, Dijon-Quetigny, 31 Mai-3 Juin 1984

ABRÉVIATIONS UTILISÉES

A	: Activité
A_x	: Activité au temps x, après la fin du 6ème choc thermique
Acty	: Actinomycine D
ADN(DNA)	: Acide désoxyribonucléique
ADN _r (rDNA)	: Acide désoxyribonucléique ribosomal
ARN(RNA)	: Acide ribonucléique
ARN _m	: ARN messenger
ARN _r	: ARN ribosomal
ATP	: Adenosine triphosphate
Coll.	: Collaborateurs
cpm	: Coup par minute
Cyclo	: Cycloheximide
D	: Densité cellulaire
D ₀	: Densité cellulaire à la fin du 6ème choc thermique
EDTA	: Acide éthylène diaminetétraacétique
IDH	: Isocitrate déshydrogénase
μl	: Microlitre
MDH	: Malate déshydrogénase
mM	: Millimolaire
μM	: Micromolaire
μm	: Micromètre
NADP	: Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
PPYS	: Proteose peptone yeast extract salts
rpm	: Rotation par minute
s	: Ecart-type
SDS	: Dodécylsulfate de sodium
TCA	: Acide trichloracétique
TMTD	: Tétraméthylthiuram disulfide = thirame
TRIS	: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
t_x	: Temps x après la fin du 6ème choc thermique
mU	: Milliunité = nanomole/minute
v	: Coefficient de dispersion = $\frac{s}{x}$
\bar{X}	: Moyenne

SOMMAIRE

	PAGE
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. <i>TETRAHYMENA</i>	4
II. LE CYCLE CELLULAIRE CHEZ <i>TETRAHYMENA</i>	6
II.1. Le cycle cellulaire normal	6
II.2. Le cycle cellulaire dans les cultures synchro- nisées	10
III. LES ENZYMES AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE CHEZ <i>TETRA- HYMENA</i>	13
III.1. L'isocitrate déshydrogénase à NADP	13
III.2. La malate déshydrogénase	15
IV. ACTION DES INHIBITEURS SPECIFIQUES	16
IV.1. Le thirame	16
IV.2. La cycloheximide et l'actinomycine D	19
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	23
I. TECHNIQUES DE CULTURE ET DE SYNCHRONISATION	24
I.1. Entretien de la souche	24
I.2. La synchronisation	25
I.2.1. Principe	25
I.2.2. Matériel	25
I.3. Le dénombrement des cellules	27
II. TECHNIQUES D'ETUDES BIOCHIMIQUES	29
II.1. Préparation de l'homogénat	29
II.2. Dosage des protéines	29
II.3. Mesure de l'activité de la malate déshydrogénase	30
II.4. Mesure de l'activité de l'isocitrate déshydrogé- nase à NADP	31
II.5. Etude de la synthèse des macromolécules : marqua- ge cumulatif	31

	PAGE
CHAPITRE III : RESULTATS	33
I. ETUDE DE L'EVOLUTION DES ACTIVITES DE L'IDH A NADP ET DE LA MDH	34
I.1. L'isocitrate déshydrogénase à NADP	34
I.1.1. Conditions de dosage de l'activité de l'IDH à NADP	34
I.1.2. Evolution de l'activité enzymatique dans les cultures	35
I.1.2.1. Activité totale	35
I.1.2.2. Activité spécifique	41
I.2. La malate déshydrogénase	41
I.2.1. Evolution de l'activité totale	41
I.2.2. Evolution de l'activité spécifique	48
II. EFFETS DU THIRAME SUR LA CROISSANCE ET SUR L'EVOLUTION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE	48
II.1. Effets du thirame sur la courbe de croissance	48
II.2. Effet du thirame sur l'activité de la MDH et de l'IDH	52
III. ETUDE DES EFFETS DE LA CYCLOHEXIMIDE ET DE L'ACTINO- MYCINE D	52
III.1. Action sur l'évolution de la population	52
III.2. Action sur l'évolution de l'activité enzymatique dans les cultures	54
III.2.1. Expression des résultats	54
III.2.2. Action de la cycloheximide et de l'acti- nomycline D sur l'évolution des activités enzymatiques dans les cultures en phase exponentielle de croissance	58
III.2.3. Action de la cycloheximide et de l'acti- nomycline D sur l'évolution de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase à NADP dans les cultures synchrones	58
III.2.3.1. Cultures synchrones normales	58
III.2.3.2. Cultures synchrones n'ayant pas subi de 6ème choc thermique	62

	PAGE
III.2.4. Action de la cycloheximide et de l'actino- mycine D sur l'évolution de l'activité de la malate déshydrogénase dans les cultures synchrones	64
CHAPITRE IV : DISCUSSION	68
I. L'EVOLUTION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DANS LES CULTURES SYNCHRONES ET LES CULTURES EXPONENTIELLES	69
II. ACTION DES INHIBITEURS ET INTERPRETATION DE L'EVOLUTION DE L'ACTIVITE AU COURS DU CYCLE SYNCHRONE	71
III. COMPARAISON ENTRE LES EFFETS DU THIRAME ET CEUX DE L'AC- TINOMYCINE D	74
CONCLUSION	76
BIBLIOGRAPHIE	79

I N T R O D U C T I O N

Le contrôle toxicologique des produits chimiques nouveaux nécessite actuellement des méthodes extrêmement lourdes et onéreuses. Aussi, le développement de méthodes, peut être moins précises, mais en tout cas plus rapides et permettant un diagnostic d'orientation en un laps de temps réduit, peuvent s'avérer intéressantes.

A ce titre les protozoaires constituent des outils prometteurs et l'un d'entre eux, *Tetrahymena*, est déjà utilisé depuis plusieurs décennies en tant que modèle cellulaire pour étudier l'impact des drogues.

Les cultures synchrones pouvant constituer un atout complémentaire, la technique a été développée depuis quelques années dans notre laboratoire et a servi à explorer les effets toxiques d'un fongicide, le thirame, sur l'ultrastructure cellulaire et sur la synthèse des acides nucléiques.

Dans un travail précédent (29), nous avons montré l'influence de ce produit sur deux enzymes mitochondriales réputées cibles : la malate déshydrogénase et la succinate déshydrogénase.

Des travaux préliminaires sur une autre enzyme, l'isocitrate déshydrogénase à NADP, ont montré un type d'action totalement différent et nous ont laissé supposer que la synthèse de cette enzyme au cours du cycle cellulaire synchrone, pouvait présenter des caractères très particuliers. Par ailleurs, le thirame s'étant avéré très actif au niveau de la synthèse d'ARN, il nous fallait également comparer son action à celle d'inhibiteurs types, l'actinomycine D et la cycloheximide, afin de nous renseigner à la fois sur la manière dont ces enzymes étaient synthétisées au cours du cycle et sur le mode d'action du thirame.

Ces objectifs ont fait l'objet des travaux que nous proposons de rapporter ici.

C H A P I T R E I :

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I - TETRAHYMENA

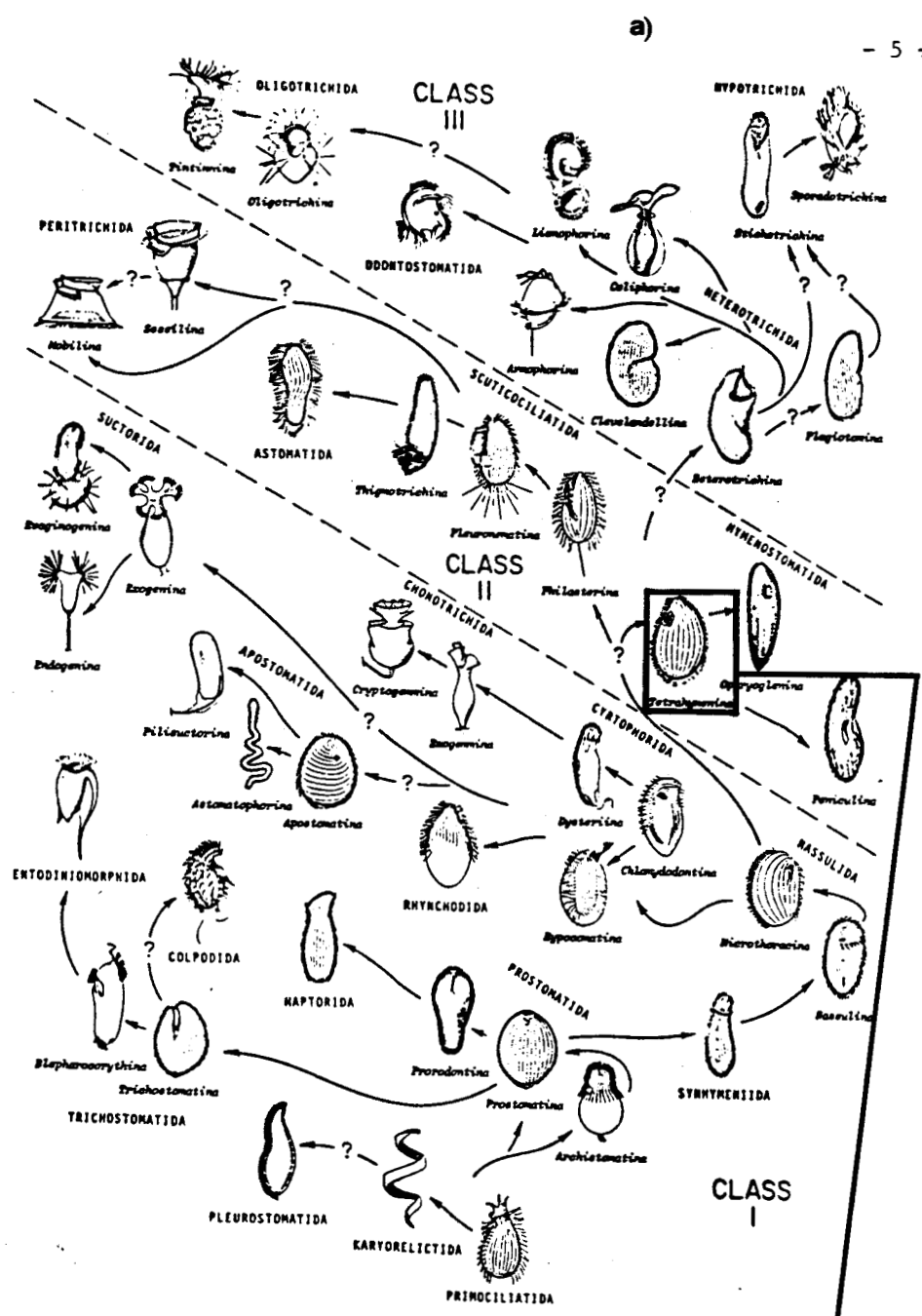
Tetrahymena est certainement le protozoaire cilié qui a été le plus étudié. Sur le plan taxonomique, il appartient à l'ordre des *Hymenostomatida* (figure 1, page 5), important dans la phylogénie des ciliés. Il possède en effet une structure buccale différenciée comprenant des membranelles et une membrane ondulante vraie, structure que l'on retrouve chez tous les ciliés holotriches les plus évolués, péritriches, hétérotriches et hypotriches.

La taxonomie du genre *Tetrahymena* reste actuellement extrêmement complexe. Deux raisons principales entrent en jeu :

- De très nombreuses espèces ont une morphologie très semblable et forment des complexes : *Tetrahymena pyriformis*, *Tetrahymena patula*, *Tetrahymena rostrata*.

- Dans un même complexe, on peut trouver à la fois des formes micronucléées que l'on peut séparer en espèces d'après leur aptitude à conjuguer ou non (syngènes), et des formes amiconucléées qu'il est très difficile de différencier car le type sexuel ne peut être utilisé comme critère de classification.

Le très grand succès de *Tetrahymena*, en tant que modèle en biologie cellulaire et moléculaire, tient à sa grande facilité de culture et à la vitesse de sa multiplication. Dans la nature, c'est un organisme habituellement bactériophage préférentiel, mais dès 1923 LWOFF (54) a pu obtenir les premières cultures stériles de *Tetrahymena*. En 1951, un milieu complètement défini était mis au point (41) et dès 1954, SCHERBAUM et ZEUTHEN (76, 77) faisaient état de leur première tentative de synchronisation de cultures. Les progrès ont été très rapides dès que les études taxonomiques ont permis de séparer *Tetrahymena* de genres proches mais beaucoup plus difficiles à cultiver (13, 31).



Classification d'après
LEVINE et coll. (44)

- Pylum : ciliophora
- Classe : oligohymenoptorea
- Sous-classe : hymenostomatia
- Ordre : hymenostomatida
- Sous-ordre : tetrahymena
- Genre : tetrahymena
- Espèce : pyriformis
- Souche : GL
- Phenonet : A

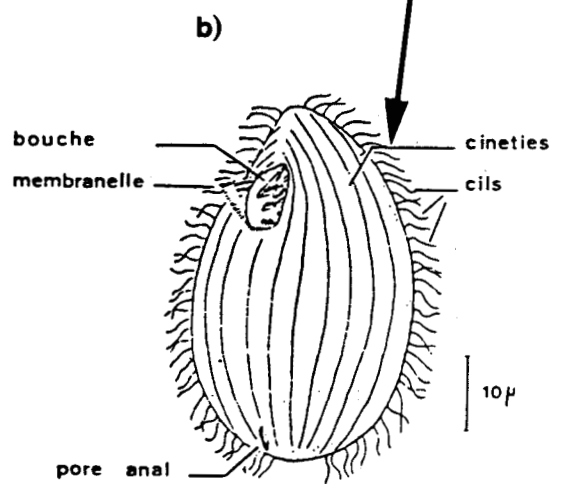


Figure 1 : a) arbre phylogénétique d'après CORLISS (14)
b) dessin schématique de *Tetrahymena pyriformis* d'après HILL (34)

Le développement de la biologie moléculaire a montré clairement la grande originalité de cet organisme, intégré dans une seule cellule et a permis d'étudier de nombreux aspects de la biochimie de ce protozoaire qui sont parfaitement applicables aux cellules d'organismes plus évolués. *Tetrahymena* a constitué également le premier modèle eucaryote disponible et facile à cultiver, pour l'étude des effets de nombreux inhibiteurs spécifiques, qui ont permis d'éclairer le mécanisme de fonctionnement de la cellule.

Dans le cadre de notre travail, nous rappellerons les caractéristiques essentielles du cycle cellulaire chez *Tetrahymena* tant dans les cultures classiques que les cultures synchronisées. Dans un deuxième temps, nous ferons le point sur les connaissances acquises sur l'isocitrate déshydrogénase à NADP et sur la malate déshydrogénase chez *Tetrahymena*. Enfin, nous consacrerons une partie à l'étude des produits qui ont été utilisés, le thirame d'une part, et les inhibiteurs spécifiques (actinomycine D et cycloheximide) d'autre part.

II - LE CYCLE CELLULAIRE CHEZ TETRAHYMENA

II.1. LE CYCLE CELLULAIRE NORMAL

Dans des cultures classiques (ou cultures de type exponentiel), *Tetrahymena* présente un cycle cellulaire à quatre phases, tel qu'il a été décrit classiquement par HOWARD et PELC (36), à savoir :

- la phase G₁, période post mitotique ou de présynthèse d'ADN ;
- la phase S ou période de synthèse d'ADN ;
- la phase G₂, période de post synthèse ou période prémitotique ;
- la phase M, période de division de la cellule ou mitose.

NILSSON (64) a bien analysé les phénomènes survenant au cours de ce cycle (figure 2a, page 8). La phase G_1 occupe 10 % de la durée du cycle. Elle se caractérise par la réorganisation nucléaire post mitotique ainsi que par de petites modifications morphologiques : passage d'une forme presque sphérique à la forme allongée caractéristique de l'espèce.

La phase S est très longue, elle occupe la moitié de la durée du cycle cellulaire.

La phase G_2 occupe à peu près un quart de la durée du cycle. Pendant cette phase va débiter le phénomène très important de la morphogenèse d'une nouvelle structure, future bouche de la cellule fille postérieure (opisthe). La division étant transversale chez *Tetrahymena* (figure 2b, page 8), la bouche initiale sera celle de la cellule antérieure (prothère), qui doit en revanche réorganiser une vacuole pulsatile. La division s'amorce lorsque l'organisation de la structure buccale atteint le stade 4, par l'individualisation dans le noyau de subnuclei, témoins d'une réorganisation du matériel nucléaire qui est polyploïde chez *Tetrahymena*. L'élongation du noyau survient au stade 5 de la morphogenèse et la division cellulaire se produit au stade 6.

Les synthèses de l'ARN total et de l'ARN nucléolaire sont continues pendant tout le cycle cellulaire. Il en est de même pour la réplication de l'ADN nucléolaire. Quant aux mitochondries, elles évoluent d'une façon indépendante pendant le cycle cellulaire (68).

Chez les cellules de mammifères, la durée de la phase G_1 varie considérablement. L'arrêt de leur multiplication entraîne un prolongement de cette phase. Le cycle pourrait être divisé en deux périodes, l'une de durée constante ($S + G_2 + M +$ une fraction de G_1), l'autre, reste de la phase G_1 , serait de durée variable (G_0), le passage de G_1 en G_0 se faisant à un point de restriction précis (53). La phase G_1 semble manquer ou être très courte chez un certain nombre de protozoaires (micronucleus de *Tetrahymena*, *Physarum polycephalum*, *Amoeba proteus*, *Schizosaccharomyces pombe*) (53).

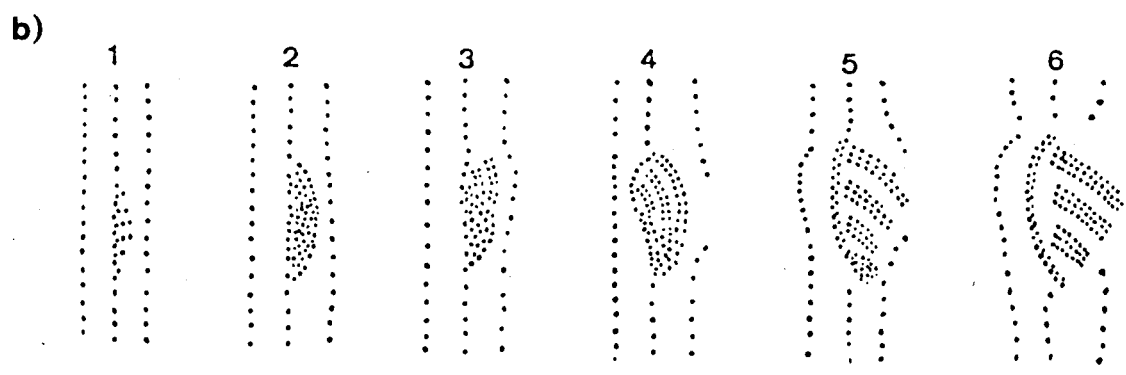
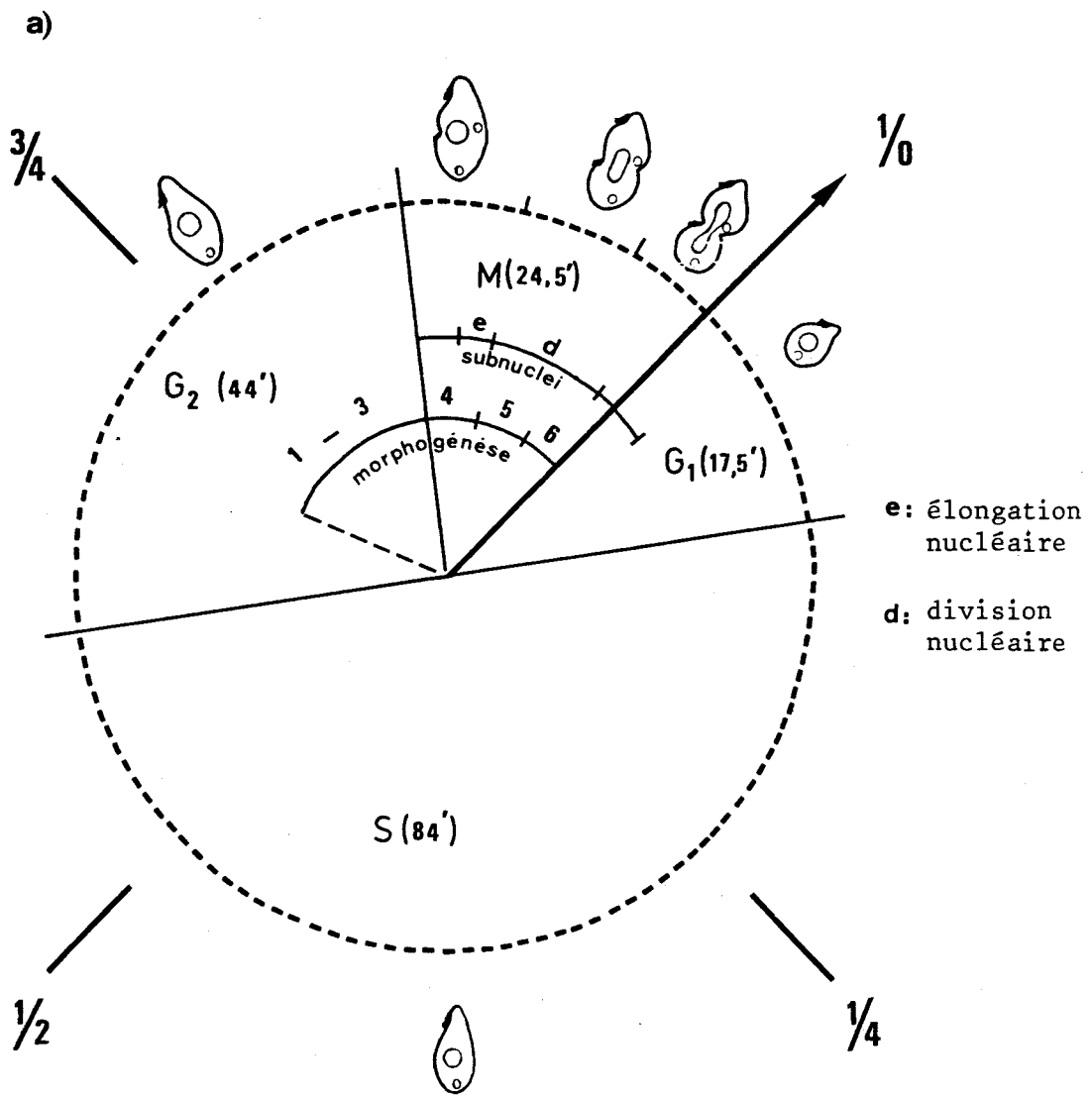


Figure 2 : a) les étapes du cycle cellulaire chez *Tetrahymena pyriformis* d'après NILSSON (64)
b) les différents stades de la morphogénèse d'après AUFDERHEIDE et coll. (5)

SUHR-JESSEN, STEWART et RASMUSSEN (83) ont étudié la durée des différentes phases du cycle chez *T. pyriformis* en cultures continues pour des durées du cycle cellulaire variant de 5 à 22 heures. Ils ont montré que l'augmentation de la durée du cycle cellulaire se faisait à la fois aux dépens des phases G_1 et G_2 et que la durée de la phase S et de la morphogénèse buccale variait très peu.

Un point très important a été de connaître si les différents événements se produisant au cours du cycle (synthèse d'ADN, morphogénèse, division nucléaire, division cellulaire) étaient sous la dépendance directe les uns des autres.

Les travaux de FRANKEL (30) sur des mutants thermosensibles de *Tetrahymena* (la division est bloquée par un choc thermique) a pu permettre la mise en évidence des points suivants :

La morphogénèse et la division micronucléaire sont coordonnées et peuvent se dérouler sans qu'il y ait division cellulaire dans les conditions d'expression de la mutation. La synthèse d'ADN continue dans les cellules en absence de division nucléaire et conduit à une accumulation d'ADN macronucléaire. Enfin, la division nucléaire n'est pas la conséquence d'une constriction mécanique causée par la division cellulaire. Elle est achevée avant la cytodierèse, peut être affectée sélectivement par la colchicine, et peut survenir, dans la cellule, à un endroit qui ne correspond pas au site de constriction cellulaire. Les travaux de FRANKEL conduisent à un modèle minimal composite où la division suit la morphogénèse alors que la synthèse d'ADN a un cycle propre. Cependant, le modèle où les trois phénomènes seraient indépendants mais reliés au niveau de points de transition par des médiateurs n'est pas exclu.

Les travaux de SUHR-JESSEN et coll. (83) ont montré que les signaux d'initiation pour la morphogénèse orale, la division nucléaire et la division cellulaire sont contrôlés au moment de l'initiation de la morphogénèse,

chacun de ces phénomènes étant achevé dans un délai fixé, quel que soit le cycle cellulaire. Selon la durée de ce dernier, le commencement de la morphogénèse intervient en fin de phase S ou pendant la phase G₂.

II.2. LE CYCLE CELLULAIRE DANS LES CULTURES SYNCHRONISEES

Très peu de méthodes de synchronisation permettent d'obtenir un cycle cellulaire normal. La sélection cellulaire, par centrifugation différentielle ou par centrifugation en continu, est certainement la méthode où l'on observe le minimum de perturbations au niveau du cycle (53). Cependant, des volumes importants de précultures sont nécessaires car seulement une petite partie de la population initiale (environ 10 %) est recueillie.

Pour les buts proposés au laboratoire, l'utilisation de drogues (colchicine, vinblastine) était exclue et les méthodes d'induction par chocs thermiques semblaient les plus sûres et les plus simples à mettre en oeuvre. Celle définie par ZEUTHEN en 1971 (87) s'efforce d'obtenir un cycle cellulaire proche de la normale et, en particulier, d'obtenir une phase S au cours de chaque cycle synchrone. Le principe consiste à appliquer des chocs thermiques espacés d'un temps égal au temps de génération normal chez *Tetrahymena*.

Les cultures ainsi synchronisées présentent des traits communs aux cultures normales :

- la phase S se déroule après chaque division synchrone ;
- les cellules sont, sur les plans morphologique et structural, pratiquement identiques à celles observées dans des cultures en phase exponentielle de croissance.

Pour l'étude de la cible cellulaire de drogues, les cultures synchronisées par la méthode de ZEUTHEN apportaient les avantages suivants :

- Un excellent taux de synchronisation (près de 90 % de cellules divisées lors du premier cycle) doublé d'un degré élevé de reproductibilité (figure 3a, page 12).

- La réplication de l'ADN total est synchrone et couplée à la division cellulaire. La synthèse de l'ADN ribosomal (rDNA) est continue avec cependant un arrêt lors de la division et une forte amplification en début de phase S (2, 3, 4, 65). L'ARN ribosomal, qui représente 90 % de l'ensemble de l'ARN chez *Tetrahymena pyriformis* GL, est synthétisé de façon synchrone pendant la phase S (40). Tandis que l'on observe une synthèse continue à taux constant des protéines cellulaires durant le cycle synchrone (30, 69), certaines comme la NADH cytochrome C réductase rotenone résistante (16), la thymidine kinase (27), l'adénylate cyclase (38), la tubuline, l'actine (7) présentent une synthèse périodique.

- Par ailleurs, les *Tetrahymena* synchronisés présentent un développement synchrone de leurs mitochondries et la division synchrone de celles-ci intervient à la fin de la phase S (43).

- La morphogénèse se déroule de façon normale à partir du point d'initiation.

Néanmoins, le traitement thermique amène quelques perturbations :

- Le cycle cellulaire de *Tetrahymena pyriformis* synchrone est dépourvu de phase G₁.

- Lors de l'élévation de température, on observe une modification du pool d'ARN messager (9, 10, 86), alors que le mécanisme de transcription et le processus de synthèse du rRNA ne sont pas affectés (37).

- On note également une chute de la quantité d'ATP (37).

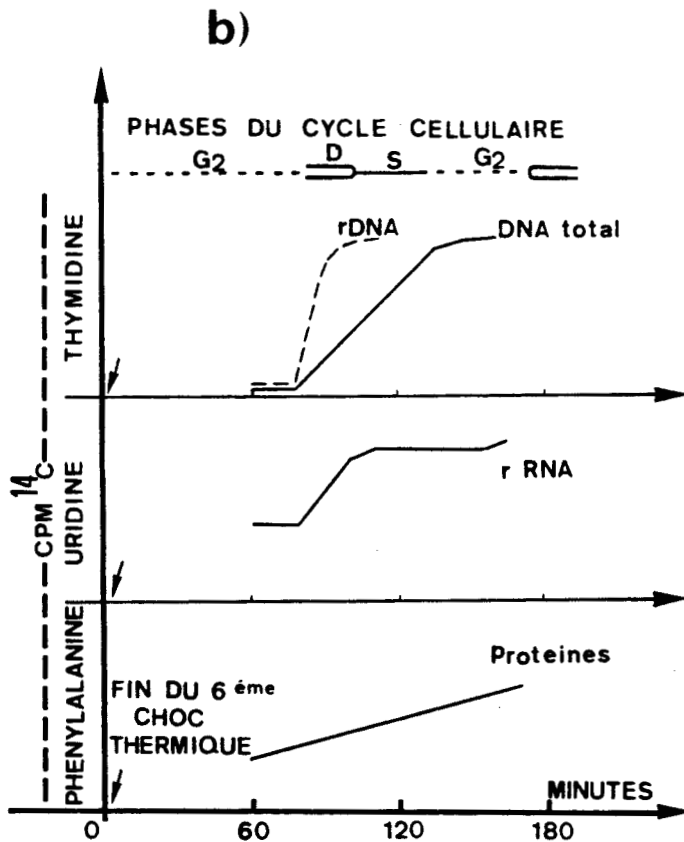
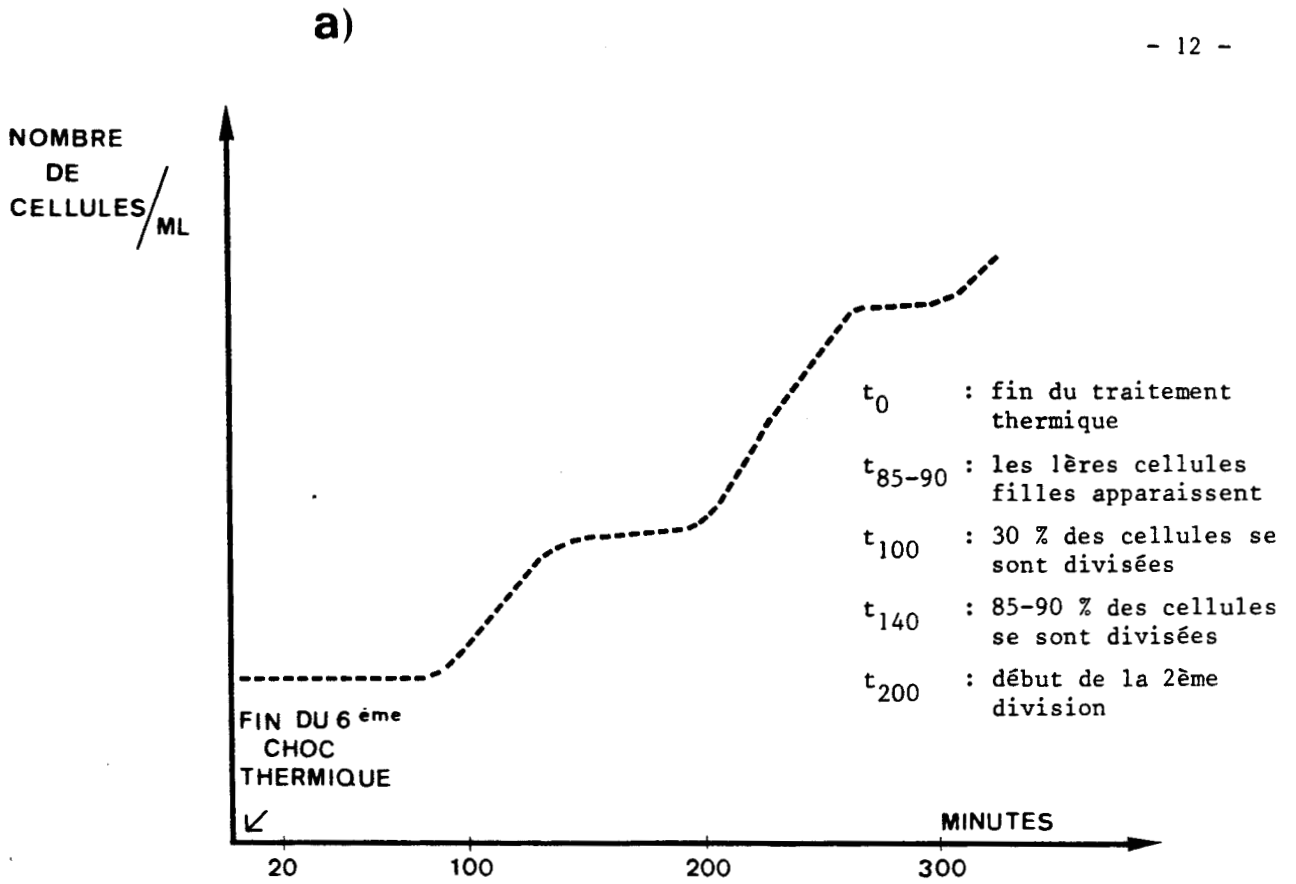


Figure 3 : a) Division synchrone de la population de *Tetrahymena*
b) Synthèses de macromolécules dans des cultures synchrones de *Tetrahymena*

- Enfin, pendant le choc thermique, on observe des modifications des structures buccales qui doivent être restaurées (retour de stomatogenèse) avant qu'une morphogenèse normale soit initiée. Celle-ci se produit pendant la phase G₂ avant la première division et pendant la phase S précédant la deuxième division.

III - LES ENZYMES AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE CHEZ TETRAHYMENA

III.1. L'ISOCITRATE DESHYDROGENASE A NADP

L'isocitrate déshydrogénase à NADP (Ec 1.1.1.42) est la seule isocitrate déshydrogénase qui ait été étudiée chez *Tetrahymena*, et les connaissances actuelles sur sa distribution et son rôle ne sont pas encore bien précises.

Deux théories s'affrontent en ce qui concerne le métabolisme intermédiaire chez *Tetrahymena*.

L'une considère que *Tetrahymena* ne possède pas d'isocitrate déshydrogénase à NAD et que la modulation du cycle de KREBS se fait par la citrate synthase (24).

L'autre théorie postule l'existence de l'isocitrate déshydrogénase à NAD car la consommation d'oxygène par les mitochondries augmente chez *Tetrahymena* quand on les incube en présence d'isocitrate ou d'acétoglutarate (61). Pour la première fois, MAY et coll. (56) ont récemment réussi à doser une activité isocitrate déshydrogénase à NAD chez *Tetrahymena*. Ils ont souligné son extrême instabilité et ont confirmé sa localisation strictement mitochondriale.

La distribution de l'isocitrate déshydrogénase à NADP, basée sur des études de fractionnement cellulaire, apparaît triple chez *Tetrahymena* (61) :

50 % de l'activité enzymatique serait liée aux péroxysomes,
5 % de l'activité serait localisée dans les mitochondries,
45 % de l'activité serait située dans le cytosol.

MAY et coll. (56) ont étudié la distribution de différentes enzymes dans des cultures de *Tetrahymena* en phase exponentielle de croissance ou en phase stationnaire.

Ils ont montré que la distribution de l'isocitrate déshydrogénase à NADP était différente pendant ces deux phases. En phase exponentielle, on en trouve 20 % dans les péroxysomes, 10 % dans les mitochondries et le reste dans le cytosol. Pendant la phase stationnaire, la distribution est de 15 % dans les péroxysomes, 10 % dans les mitochondries, 35 % dans le cytosol et 40 % dans une fraction de densité 1,165-1,18 où elle se trouve associée à de la catalase, de la succinate déshydrogénase et de la fumarase. Dans les cultures en phase exponentielle, on ne retrouve pas cette association enzymatique mais, si les cellules sont placées en hypoxie pendant quatre heures afin d'achever les cycles de division et d'activer la néoglycogénèse, on retrouve le même profil de distribution enzymatique que dans les cultures en phase stationnaire. Les enzymes sont localisées dans une structure commune car, en modifiant la densité de la fraction incriminée, on observe un déplacement simultané de tous les pics d'activité.

L'analyse en microscopie électronique a permis à MAY et coll. (56) d'observer dans les fractions provenant de cellules en phase stationnaire ou de cellules activées pour la néoglycogénèse, des structures particulières, grandes vacuoles contenant des débris de mitochondries, des péroxysomes ainsi que de grosses quantités de glycogène. Ces structures ressemblent à des vacuoles autophagiques à différents stades d'évolution.

Dans les cellules en phase exponentielle de croissance, on ne les observe pas. Dans ces structures, on ne retrouve que des quantités négligeables de citrate synthase, d'acylCoA déshydrogénase, d'isocitrate déshydrogénase à NAD et de lactate oxydase. Toutes les enzymes de la β oxydation ainsi que la glucose 6 phosphate isomérase se trouvent dans ces vacuoles.

Dans des cellules en phase exponentielle de croissance, cette dernière enzyme est localisée dans les lysosomes.

MAY, ANDERSON et HOGG suggèrent donc que les vacuoles autophagiques observées correspondent au site de la néoglycogénèse chez *Tetrahymena*. L'isocitrate déshydrogénase catalyserait le passage de l' α cétooglutarate à l'isocitrate et entrerait d'autant moins en compétition pour l'isocitrate avec l'isocitrate lyase, qu'elle est inhibée par de faibles concentrations de glyoxylate et d'oxaloacétate (79).

A l'appui de cette hypothèse, il faut souligner que, dans le milieu protéose peptone sans glucose, utilisé pour les cultures, l'acide glutamique constitue, quantitativement, l'acide aminé le plus abondant (20).

Par ailleurs, il semble que l'isocitrate déshydrogénase cytosolique fournirait les équivalents réducteurs nécessaires pour la synthèse des acides gras (79).

Aucune donnée n'est connue actuellement sur l'évolution de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase à NADP au cours du cycle cellulaire de *Tetrahymena*. Chez *Schizosaccharomyces pombe*, POOLE et LLYOD (71) ont montré que la concentration cellulaire d'enzyme présentait un pic majeur et un pic secondaire au cours du cycle.

III.2. LA MALATE DESHYDROGENASE

Chez *Tetrahymena*, la malate déshydrogénase (EC 1.1.1.37) se trouve en majeure partie dans la mitochondrie (61) mais on a également observé une activité cytosolique (25, 78). Cette dernière permettrait la transformation du malate fourni par le cycle glyoxylique en oxaloacétate lors de la glyconéogénèse (79).

Quant à son isoenzyme mitochondriale, il a été supposé tout récemment qu'une de ses fonctions pouvait être la production de malate pour la MDH cytoplasmique, qui possède une affinité plus grande pour le malate que l'enzyme mitochondriale (25). COWAN et YOUNG (16) ont étudié l'évolution de quelques enzymes mitochondriales chez *Tetrahymena pyriformis* ST dont la malate déshydrogénase. Ils ont trouvé une activité spécifique constante au cours du cycle. Cependant, lors de travaux précédents, nous avons observé une augmentation significative de cette activité pendant les 140 premières minutes du cycle (29).

Dans des cultures synchrones de levure, une augmentation par palier de l'activité de l'enzyme a été mise en évidence (15, 71).

IV - ACTION DES INHIBITEURS SPECIFIQUES

IV.1. LE THIRAME

Le thirame (formule brute $C_6H_{12}N_2S_4$) est un carbamate connu sous de multiples dénominations (Bis diméthylthiocarbamoyl disulfide, tétraméthylthiuram disulfide, tétraméthylthioperoxydicarbonic diamide).

Il est commercialisé sous forme de préparations contenant, en général, 25 % de produit pur : arasan ou thiosan (72), mercuran (42).

Le TMTD est classé parmi les dérivés thiuramiques auxquels appartiennent les disulfures de thiurames comme le TETD encore appelé Antabuse, utilisé dans la lutte antialcoolique.

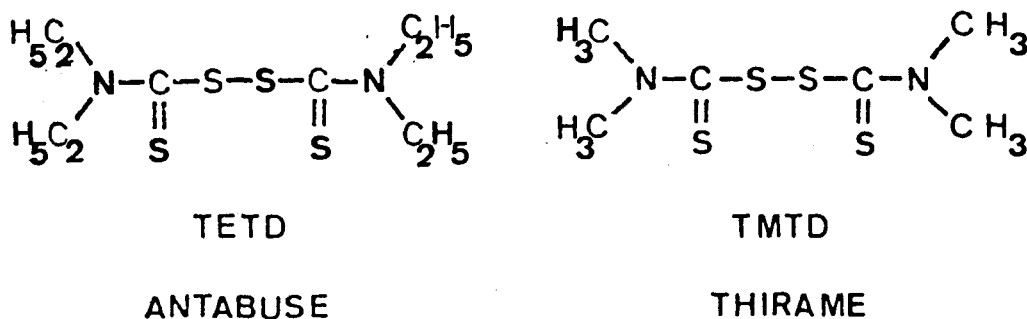


Figure 4 : Structure de l'Antabuse et du Thirame

D'origine américaine et initialement synthétisé comme agent vulcanisant (32), le TMTD reste très utilisé dans l'industrie chimique comme accélérateur de réactions radicalaires (surtout en vulcanisation), et comme inhibiteur de la corrosion (protection des canalisations...).

Mais depuis la découverte de ses propriétés insecticides, fongicides et répulsives vis-à-vis de certains oiseaux et rongeurs (32), il est largement utilisé en agriculture : 7534 tonnes en 1971, 11422 tonnes en 1978, soit pour cette même année 64 % des fongicides utilisés (75). Le thirame montre une toxicité nulle vis-à-vis des plantes (sous respect de la réglementation française des pesticides agricoles éditée par ACTA-PNGPC) et faible *in vivo* chez le rat ($DL_{50} = 865 \text{ mg/kg}$, ACTA 1977). Il est employé pour le traitement des semences et des parties aériennes des plantes, et comme agent répulsif contre certains animaux.

Ce n'est qu'à partir des années 1960, soit 40 ans après le début de son utilisation industrielle, que l'on s'est soucié de l'action du thirame

sur les organismes et sur l'environnement. On s'est alors rendu compte que le thirame pouvait être toxique pour de nombreux organismes autres que les cibles d'utilisation en agriculture :

- Bactériostatique à l'égard de certains cocci (84), le TMTD modifie profondément la microflore du sol par son action bactéricide sélective (39). Il est inactif envers les bactéries symbiontes des végétaux (26, 33, 67, 82).

- Les végétaux semblent très tolérants. On notera néanmoins une inhibition de la photosynthèse chez certaines algues (46, 47, 48, 49, 50, 51, 52).

- Le thirame inhibe la croissance des protozoaires ciliés pour des doses inférieures au ppm (21, 32). Il est toxique envers la Daphnie (59) et la limnée *Lymnaea stagnalis* (8), alors que l'un de ses catabolites, la diméthylamine, corrode la peau et les branchies des poissons (63). Chez les mammifères et les oiseaux, le TMTD affecte le fonctionnement des gonades et de la thyroïde, alors que chez l'homme en contact permanent avec ce produit, la quasi totalité des organes sont touchés : modification de la formule sanguine, dérèglements hormonaux, lésions du système nerveux central, de l'appareil vasculaire, du système hépatobiliaire, de l'appareil visuel (32). On a également observé des dermatites et allergies (32), une embryotoxicité se manifestant notamment par des anomalies morphologiques foetales, une stérilité secondaire et des avortements.

Les modifications métaboliques du TMTD par *Pseudomonas* évoqueraient la transformation suivante (32) :



Ces produits de dégradation s'observent aussi dans les urines des ruminants et d'autres mammifères, ils sont toutefois potentiellement toxiques : le disulfure de carbone inhibe la monoamine oxydase et l'alcool déshydrogénase

(57,73). Quant à la diméthylamine, elle peut se combiner aux nitrites et conduire à la formation de diméthylnitrosamine dont l'action carcinogène est bien connue.

Quelques hypothèses ont été avancées quant au mode d'action du thirame : LINDHAL et AKERSTROM (52) pensent que le TMTD inhibe les enzymes respiratoires en bloquant de façon réversible les fonctions thiol de ces enzymes.

Chez *Tetrahymena pyriformis*, lors de travaux précédents (29), nous avons observé une inhibition de l'évolution de l'activité de la malate déshydrogénase et de la succinate déshydrogénase dans les cultures en présence de 1,25 µg/ml de produit.

A 0,5 µg/ml, on note une action sur la SDH mais plus sur la MDH. Par contre, lorsque le thirame est testé directement sur des homogénats cellulaires, il n'inhibe l'activité que pour des doses extrêmement élevées (8 µg/ml).

Le TMTD s'est révélé particulièrement actif vis-à-vis de la synthèse d'ADN (0,25 µg/ml) et surtout d'ARN (0,125 µg/ml) (81).

Par ailleurs, une étude en microscopie électronique a mis en évidence des altérations essentiellement sur les nucléoles, le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Lorsque le thirame est ajouté en début de cycle, on observe des perturbations profondes suivies d'une détoxification et d'une récupération de la cellule. Si le produit est administré, toujours à forte dose (1,25 µg/ml), au moment de la division, des altérations irréversibles sont induites au niveau des mitochondries et la cellule meurt (58).

IV.2. LA CYCLOHEXIMIDE ET L'ACTINOMYCINE D

La cycloheximide, comme pour les autres systèmes cellulaires, est un excellent inhibiteur de la synthèse des protéines chez *Tetrahymena* (34).

Elle empêcherait la formation de liaisons peptidiques au niveau des ribosomes 80s (30, 80). Chez *Tetrahymena*, bien que la synthèse protéique soit fortement inhibée par de faibles doses de cycloheximide, on n'observe pas, comme chez les mammifères, une réduction significative du taux de synthèse du DNA total (85). L'initiation de l'élongation se poursuit en présence de 0,5 μ mole de produit, pendant une période importante, la chute de la synthèse n'excédant pas 15 % au bout de 90 mn. En revanche, on observe l'accumulation d'intermédiaires de réplication de taille définie (41 s), qui s'accumulent sans former d'ADN de haut poids moléculaire. Cette accumulation se produit chez *Tetrahymena* pour des doses plus faibles que celles nécessaires pour bloquer la synthèse des protéines. Si les cellules sont lavées, les intermédiaires de réplication sont alors convertis en ADN de haut poids moléculaire. Ces résultats sont interprétés par WESTERGAARD et coll. (85) comme la conséquence de l'action directe de la cycloheximide sur l'une des activités enzymatiques directement impliquée dans les processus de maturation.

L'actinomycine D est largement utilisée comme inhibiteur de la synthèse du RNA. Chez *Tetrahymena*, il a été montré que de fortes doses (25 - 100 μ g/ml) sont nécessaires pour bloquer la division cellulaire (62, 74, 86, 88). De telles doses permettent d'obtenir rapidement une concentration intracellulaire efficace, l'actinomycine D entrant principalement dans la cellule par phagocytose (62).

L'actinomycine D se fixe sur le DNA. AIVASASHVILLI et BEABEALASHVILLI (1) ont montré, *in vitro*, que la transcription des ADN des bactériophages T₇ et D III T₇ était arrêtée. L'analyse des produits de transcription, en présence de faibles doses de l'inhibiteur, montre que l'élongation s'interrompt au voisinage d'un tétranucléotide 5' X GC Y 3' où X \neq G et Y \neq C. Le dernier nucléotide de la chaîne pouvant être X ou G.

Dans les cultures de cellules de mammifères, l'actinomycine D bloque préférentiellement la synthèse de rRNA et provoque, sur le plan ultrastructural,

une ségrégation du matériel nucléolaire. Cette action peut s'expliquer aisément par la richesse en paires de bases G-C de l'ADN ribosomal d'une part et par la structure en tandem du rDNA d'autre part (6). Chez *Tetrahymena pyriformis*, la synthèse d'ARN est affectée dans son ensemble en présence d'actinomycine D. ERNST et OLEINICK (23) ont montré que la synthèse d'ARN poly A⁺ est inhibée dans la même proportion que celle des ARN poly A⁻ pour des concentrations d'actinomycine D égales ou supérieures à 5 µg/ml. Pour de très fortes concentrations, l'inhibition survient en moins de 10 mn et la synthèse est totalement bloquée.

Le transfert vers le cytoplasme des rRNA synthétisés dans le noyau est stoppé lorsque la drogue est ajoutée après un marquage préalable, de courte durée, par l'uridine tritiée. On observe une accumulation considérable du marquage des précurseurs d'ARNr dans le noyau et une diminution du marquage des ARNr cytoplasmiques (22).

Les travaux de ERNST et OLEINICK (23) montrent également une disparition progressive des polysomes dans les cellules de *Tetrahymena* traitées par l'actinomycine D. La disparition est totale au bout de 60 mn en présence de 50 µg/ml d'actinomycine D. L'incorporation de ³⁵S méthionine en position N-terminale ou en position interne dans les polypeptides synthétisés après addition de l'inhibiteur est identique à celle observée dans le témoin pendant tout le temps où les polysomes restent intacts. Par des expériences complémentaires, ces auteurs ont démontré que l'action de l'actinomycine D sur les polysomes et la synthèse protéique n'avait pas pour origine une inhibition de la translation mais constitue un effet secondaire à l'inhibition de la transcription.

CARATERO et coll. (11) ont confirmé l'action de l'actinomycine D sur le nucléole de *Tetrahymena* et CURGY (18) a observé une action de l'antibiotique sur la transcription mitochondriale.

Récemment, CRAIG et KOSTURA (17) ont montré que chez les cellules CHO traitées par l'actinomycine D, les lysats cellulaires sont déficients sur le

plan de la translation. Cette dernière n'est pas affectée, dans des lysats de cellules non traitées, en présence d'actinomycine D. L'inhibiteur n'agit donc pas directement sur le système de translation, mais induit une déficience lors de l'initiation et ceci après la formation du complexe 40s.

Lors de travaux préliminaires, nous avons observé que le thirame n'agissait pas de façon identique sur l'évolution de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase à NADP d'une part, et sur celle de la malade déshydrogénase d'autre part. Les expériences d'incorporation d'uridine marquée et la microscopie électronique avaient montré une action spectaculaire du thirame sur les synthèses d'ARN.

Cette discordance nous a amené à supposer l'existence d'un mRNA préformé pour cette enzyme, phénomène mis en évidence pour la TMP synthétase chez *Tetrahymena* (19).

Aussi, dans un premier temps, nous avons suivi l'évolution de l'isocitrate déshydrogénase à NADP au cours du cycle synchrone de *Tetrahymena*, ce travail n'ayant jamais été réalisé précédemment. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'IDH et la MDH, afin de pouvoir comparer ces effets à ceux du thirame.

C H A P I T R E I I :

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

I - TECHNIQUES DE CULTURE ET DE SYNCHRONISATION

I.1. ENTRETIEN DE LA SOUCHE

L'organisme avec lequel ont été faites les études est le protozoaire cilié *Tetrahymena pyriformis*, souche GL, phenoset A (figure 1, page 5). Il provient de l'"Institut Carlsberg" de Copenhague.

Les cellules de *Tetrahymena* sont maintenues en phase exponentielle de croissance par repiquage quotidien sur milieu PPYS, selon PLESNER et coll. (70), à raison de 50 μ l pour 10 ml de milieu, en étuve à 28°C.

- Composition du milieu PPYS :

. Proteose Peptone Base	100	ml
. Solution A	1	ml
. Solution B	1	ml

(a) Milieu de base Proteose Peptone

. Proteose Peptone	7,5	g
. Yeast extract	7,5	g
. Eau distillée q.s.p.	1	l

(b) Solution A

. $MgSO_4, 7H_2O$	1	g
. $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2, 6H_2O$	0,25	g
. $MnCl_2, 4H_2O$	5	mg
. $ZnCl_2$	0,5	mg
. Eau distillée q.s.p.	100	ml

(c) Solution B

. CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,5 g
. CuCl ₂ , 2H ₂ O	50 mg
. FeCl ₃ , 6H ₂ O	12,5 mg
. Eau distillée q.s.p. ...	100 ml

On fait bouillir pendant 5 minutes le milieu PPYS, puis on filtre sur papier filtre sans cendres et on stérilise 20 minutes à 121°C.

I.2. LA SYNCHRONISATION

I.2.1. PRINCIPE

On induit dans des cultures de *Tetrahymena pyriformis* une multiplication synchrone des cellules par une série de chocs thermiques. La méthode de synchronisation utilisée est celle de ZEUTHEN (87) dite "un choc par génération". Les cultures réalisées à 28°C (température optimale de croissance) subissent des chocs de 20 mn à 34°C (température limite tolérée) séparés par des intervalles de 160 minutes (durée d'un cycle cellulaire normal chez *Tetrahymena pyriformis* GL dans le milieu employé).

Six cycles de traitement successifs sont appliqués et la culture est utilisée dès la fin du 6ème choc. Elle est répartie dans des fioles placées ensuite à 28°C. On ajoute l'inhibiteur ou le toxique à un moment "t" après la fin du 6ème choc thermique pris comme temps 0.

La figure (2, page 8) montre l'évolution d'une culture synchrone et une image des principaux évènements qui y surviennent.

I.2.2. MATERIEL

La synchronisation est obtenue dans un système (figure 5 a, page 26) qui comprend :

(a)

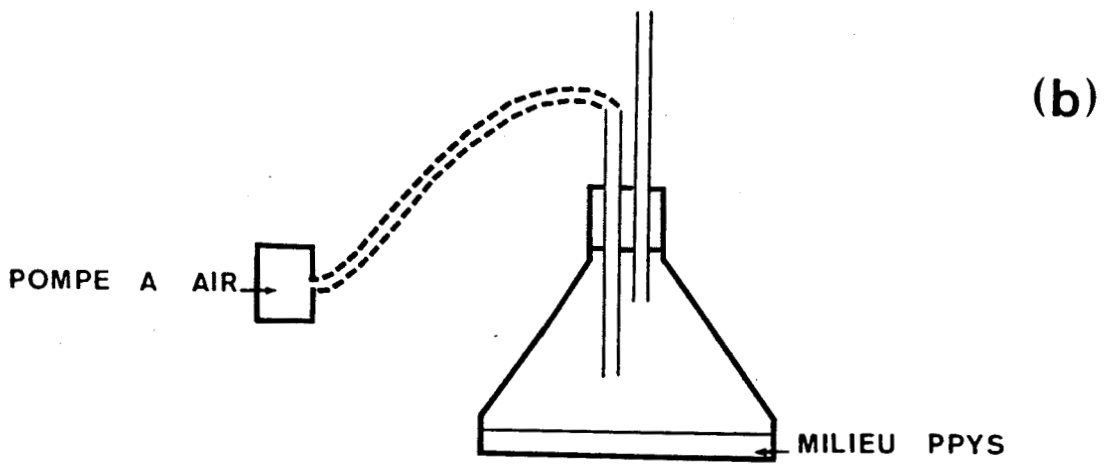
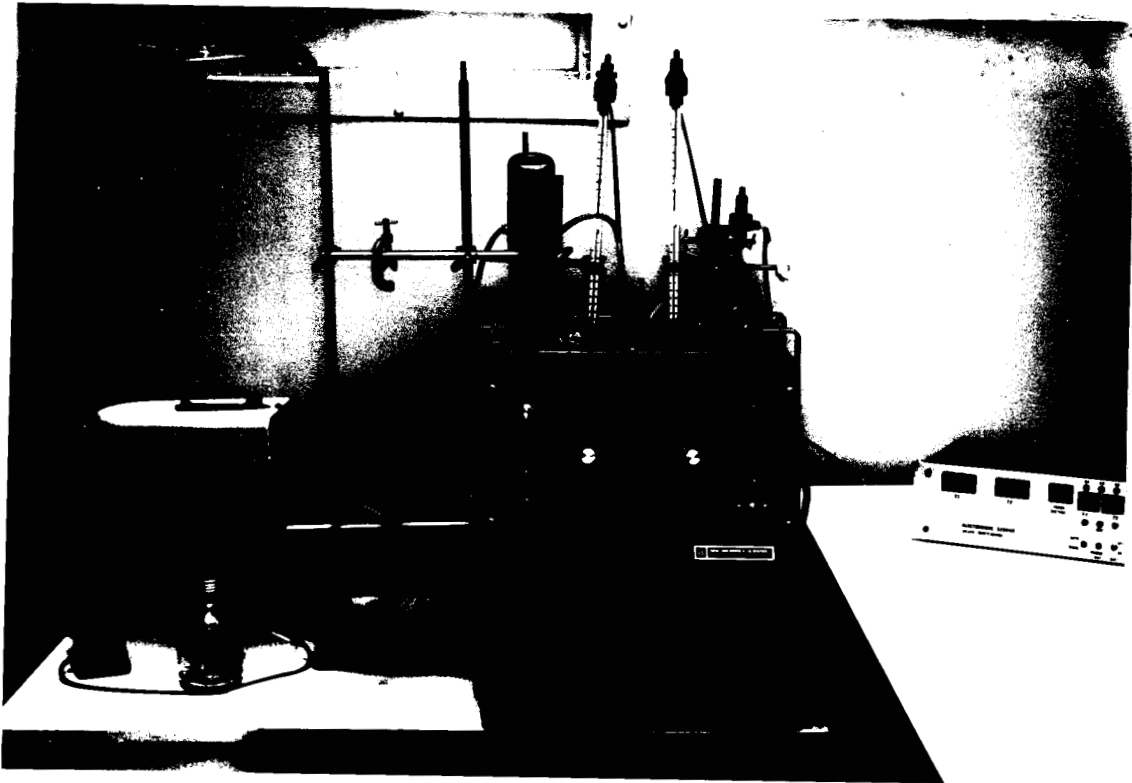


Figure 5 : a) Le synchronisateur

b) Conditionnement de la culture de *Tetrahymena pyriformis*

- un bain marie agité (New Brunswick Scientific), transformé pour les besoins des expériences.
- une boîte électronique (Electronique Service, 32320 Montesquiou) assurant la régulation de la température par l'intermédiaire de thermomètres à contact plongeant dans le bain marie.
- Un système de régulation thermique asservi aux thermomètres à contact comprenant :
 - . une résistance de chauffe pour chacun des régimes thermiques
 - . une source extérieure de liquide froid
 - . un enregistreur de température qui sert à contrôler le régime thermique du bain
 - . un système d'aération

Nous avons réalisé les cultures dans des fioles de Fernbach de 2.500 ml contenant 700 ml de milieu PPYS conditionnées selon la figure 5b page 26 . L'air apporté sert à renouveler l'atmosphère surmontant la culture, mais il n'est pas injecté dans le milieu. La culture est constamment agitée (71 rpm). L'inoculum provient d'une culture de 24 heures et sa concentration initiale est de 800 cellules/ml.

I.3. LE DENOMBREMENT DES CELLULES

La numération des cellules se fait par comptage électronique, à l'aide d'un Coulter Counter Zm. Cet appareil permet le dénombrement des Ciliés mis en suspension dans un électrolyte. L'organe détecteur est un microorifice incorporé à un tube plongeant dans la suspension. De part et d'autre de ce microorifice, sont placées deux électrodes en platine entre lesquelles est appliqué un courant continu. En passant au travers de l'orifice, les particules déplacent un volume d'électrolyte égal à leur propre volume et font ainsi varier la résistance de l'orifice. La valeur de cette variation ou impulsion est directement proportionnelle au volume des particules. L'échantillon à analyser est aspiré au travers de l'orifice grâce à un manomètre à mercure.

L'étalonnage de l'appareil est effectué avec des suspensions de particules calibrées de taille connue, proche de celle des Protozoaires à dénombrer. Nous avons utilisé une suspension de pollen de noisetier, de 21,4 μm de diamètre de sphère équivalente (Coultronics France). L'appareil est réglé de telle sorte que les particules parasites ne peuvent être totalisées.

Les réglages particuliers de l'appareillage sont les suivants :

- Diamètre de microorifice	140 μm
- Courant d'ouverture	1 mA
- Trimmer de gain	1
- Atténuateur	64
- Seuil inférieur de détection des particules .	12 μm de diamètre de sphère équivalente

Avant tout comptage, l'échantillon doit être fixé. La fixation est réalisée de la manière suivante : 1 ml de culture est fixé dans des godets de comptage par 1 ml de glutaraldehyde à 2,5 %. On ajoute 10 ml d'une solution NaCl à 10 %, filtrée sur membrane Millipore de 0,45 μm . On homogénéise et on pratique trois numérations (0,5 ml sont analysés à chaque numération). L'échantillon étant dilué douze fois et le comptage effectué sur 0,5 ml, on obtient le nombre de cellules contenues dans 1 ml de culture en multipliant la somme des trois numérations par huit.

II - TECHNIQUES D'ÉTUDES BIOCHIMIQUES

II.1. PREPARATION DE L'HOMOGENAT

Nous avons employé la méthode décrite par COWAN et YOUNG (16). Dans un pot à centrifuger conique de 50 ml, contenant 10 ml de milieu d'homogénéisation à 4°C (sucrose 0,35 M - EDTA 0,001 M - Tampon Tris - HCl pH 7 0,01 M). On dépose de 5 à 15 ml de culture selon la quantité de cellules nécessaires pour obtenir une activité enzymatique convenable. On centrifuge à 800 g pendant 10 minutes à 4°C, dans une centrifugeuse réfrigérée Jouan Modèle E 96. On rejette le surnageant, milieu et liquide de lavage, les cellules ainsi préparées sont parfaitement débarrassées de leur milieu de culture et ne nécessitent plus d'autres lavages.

Le culot est ensuite homogénéisé à l'aide d'un désintégrateur à ultrasons avec sonde de titane (MSE Instruments). Les cellules sont remises en suspension dans un tube à hémolyse, plongé dans de la glace, avec 1 ml de liquide d'homogénéisation dilué au quart. Elles sont soumises pendant trente secondes, à une amplitude de 7 μ m soit 20 kilocycles par seconde. On utilise une sonde dont le diamètre est compatible avec celui des tubes à hémolyse. L'homogénat est congelé immédiatement à l'azote liquide afin de mieux conserver l'activité des enzymes.

II.2. DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines ont été dosées par la méthode de LOWRY modifiée par MARKWELL et coll. (55). Cette méthode permet le dosage des protéines, dans des homogénats sans solubilisation préalable à la soude et autorise l'étude des échantillons contenant jusqu'à 100 mM de sucrose et 2,5 mM d'EDTA. Afin de rester dans ces zones de concentrations, nos culots de lavage ont été recueillis dans le milieu d'homogénéisation dilué au 1/4.

Les réactifs sont :

- Réactif A :
 - . $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ 2 %
 - . NaOH 0,4 %
 - . Tartrate de sodium .. 0,16 %
 - . SDS 1 %
 - . eau distillée qsp.... 100 ml
- Réactif B :
 - . $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ 4 %
 - . eau distillée qsp.... 100 ml
- Réactif C : à préparer extemporanément :
 - 100 parties de réactif A pour
 - 1 partie de réactif B

Mode opératoire :

A 0,5 ml d'échantillon contenant 10 à 100 μg de protéines, on ajoute 1,5 ml de réactif C. On laisse incuber 10 minutes à température ambiante puis on ajoute 150 μl de réactif de Folin-ciocalteu, dilué au 1/2 dans l'eau distillée, juste avant l'emploi. On mélange vigoureusement au Vortex et on laisse 45 minutes à température ambiante. La lecture se fait ensuite à 660 nm.

II.3. MESURE DE L'ACTIVITE DE LA MALATE DESHYDROGENASE

Nous avons employé la méthode de MULLER et coll. (61). Les réactifs employés sont des réactifs Merck ou Sigma, qualité biochimique.

Réactifs :

. Tampon Tris HCl pH 7,6	20	mM
. NADH	100	μM
. MgCl_2	3,3	mM
. Triton X100	0,066	%
. Acide oxaloacétique	0,3	mM

Mode opératoire :

Le milieu réactionnel contient 1,80 ml de tampon, 50 μl de NADH,

50 μ l de $MgCl_2$, 20 μ l de Triton X100 et 30 μ l d'homogénat. La réaction est déclenchée par l'addition de 50 μ l d'acide oxaloacétique et la température de travail est de 25°C. On mesure la décroissance de la densité optique à 340 nm, par rapport à un témoin contenant tous les réactifs excepté l'acide oxaloacétique.

II.4. MESURE DE L'ACTIVITE DE L'ISOCITRATE DESHYDROGENASE A NADP

Nous avons utilisé la méthode d'ODA et coll. (66) que nous avons modifiée.

Réactifs :

. Tampon Tris HCl, pH 8,2	50	mM
. NADP	0,5	mM
. $MnCl_2$	0,5	mM
. Triton X100	0,025	%
. Isocitrate	5	mM

Mode opératoire :

Le milieu réactionnel comprend 1,73 ml de tampon, 50 μ l de $MnCl_2$, 50 μ l de NADP, 20 μ l de Triton X100 et 100 μ l d'homogénat. La réaction est déclenchée par l'addition de 50 μ l d'isocitrate, à la température de 25°C. On mesure la croissance de la densité optique à 340 nm, par rapport à un témoin contenant tous les réactifs excepté l'isocitrate.

II.5. ETUDE DE LA SYNTHÈSE DES MACROMOLÉCULES : MARQUAGE CUMULATIF

La culture conditionnée est séparée en aliquotes de volume suffisant pour pouvoir suivre le marquage (entre 20 et 50 ml selon le nombre d'échantillons à prélever). On ajoute alors 0,1 μ Ci de précurseur par ml de culture.

Le produit marqué est préalablement dilué dans le milieu PPYS de façon à ce que la radioactivité nécessaire au marquage soit apportée dans 1 à 2 ml de milieu.

1 ml de culture mise en contact avec le précurseur radioactif est précipité en bain de glace, dans des tubes à hémolyse, par un volume égal d'une solution à 10 % d'acide trichloracétique maintenue à 0°C. Après 30 mn de contact, le contenu du tube est filtré sous vide sur un filtre GF/F WHATMAN de 25 mm de diamètre. Le tube est rincé 2 fois par 3 ml de TCA à 5 % à 0°C, puis le filtre est lui-même rincé par 3 fois 10 ml de TCA 5 % à 0°C, puis 5 ml d'eau et 5 ml d'éthanol. Le filtre est ensuite séché, puis introduit dans une fiole à scintillation de 20 ml. On ajoute alors 5 ml de liquide scintillant (lipoluma). On effectue 3 comptages de 10 mn au compteur à scintillation liquide. Les résultats sont exprimés, en fonction de la population cellulaire, en cpm incorporé/ml de culture.

CHAPITRE III :

RESULTATS

I - ETUDE DE L'ÉVOLUTION DES ACTIVITÉS DE L'IDH À NADP ET DE LA MDH

I.1. L'ISOCITRATE DESHYDROGENASE A NADP

Pour leurs travaux sur *Euglena gracilis*, ODA et coll. (66) ont utilisé un ion activateur différent et un pH éloigné de celui utilisé par MULLER et coll. (61) pour leur étude de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase à NADP. Les activités obtenues par la méthode de MULLER étant peu élevées, nous avons cherché à améliorer la méthode de dosage et nous avons vérifié la stabilité des extraits pour obtenir un protocole compatible avec des prélèvements répétitifs rapprochés, qui sont nécessaires pour l'étude de l'activité enzymatique au cours du cycle cellulaire synchrone de *Tetrahymena*.

I.1.1. Conditions de dosage de l'activité de l'IDH à NADP

A partir des conditions de dosage préconisées par MULLER et coll. (61) (tampon phosphate 66 mM pH 7,4, NADP 100 μ M, $MgCl_2$ 3,3 mM, isocitrate 6,6 mM), la modulation de la concentration des différents réactifs n'a pas amélioré les résultats, en particulier, l'activité restait constante entre les pH 7,4 et 8,6.

Le remplacement du magnésium par le manganèse et le passage en tampon Tris pH 8 ont permis d'obtenir 40 % d'activité en plus, sur le même homogénat par rapport à la méthode de MULLER et coll.

Nous avons alors pu définir les conditions optimales de dosage en ce qui concerne le pH et la concentration en ion **manganèse**.

. Le pH optimal est de 8,2 - 8,4 (figure 6a, page 36).

. L'ion manganèse active la réaction de façon plus significative que l'ion magnésium (figure 6b, page 36). La concentration fixée pour les dosages ultérieurs a été de 0,5 mM.

L'isocitrate entre 1 et 10 mM et le NADP entre 0,1 et 1 mM ne modifient pas significativement l'activité obtenue.

En conséquence, les conditions de dosage de l'IDH à NADP ont été fixées comme suit :

- tampon Tris HCl, pH 8, 2	50	mM
- NADP	0,5	mM
- MnCl ₂	0,5	mM
- Triton X ₁₀₀	0,025	%
- Isocitrate	5	mM

Enfin, nous avons constaté que l'enzyme se dégrade rapidement à 0°C (figure 6c, page 36). On observe une perte de 25 % de l'activité en quatre heures. La congélation des échantillons à l'azote liquide, immédiatement après le broyage des cellules, s'est donc avérée indispensable. En outre, cette congélation permet une conservation intégrale de l'activité enzymatique pendant au moins 24 heures (figure 6c, page 36).

1.1.2. Evolution de l'activité enzymatique dans les cultures

1.1.2.1. Activité totale

A la fin du 6ème choc thermique (t_0), la population n'est pas toujours rigoureusement identique d'une expérience à l'autre. Les deux principales causes d'erreur sont :

- L'erreur de reproductibilité de l'inoculum qui se trouve amplifiée par l'évolution de la population. Dans le modèle théorique, l'évolution est de la forme $D_t = 2^6 D_0 = 64 D_0$.

- Les modifications de l'index de division (% de cellules qui se divisent au cours du cycle). Ainsi, si l'index de division passe de 100 % à

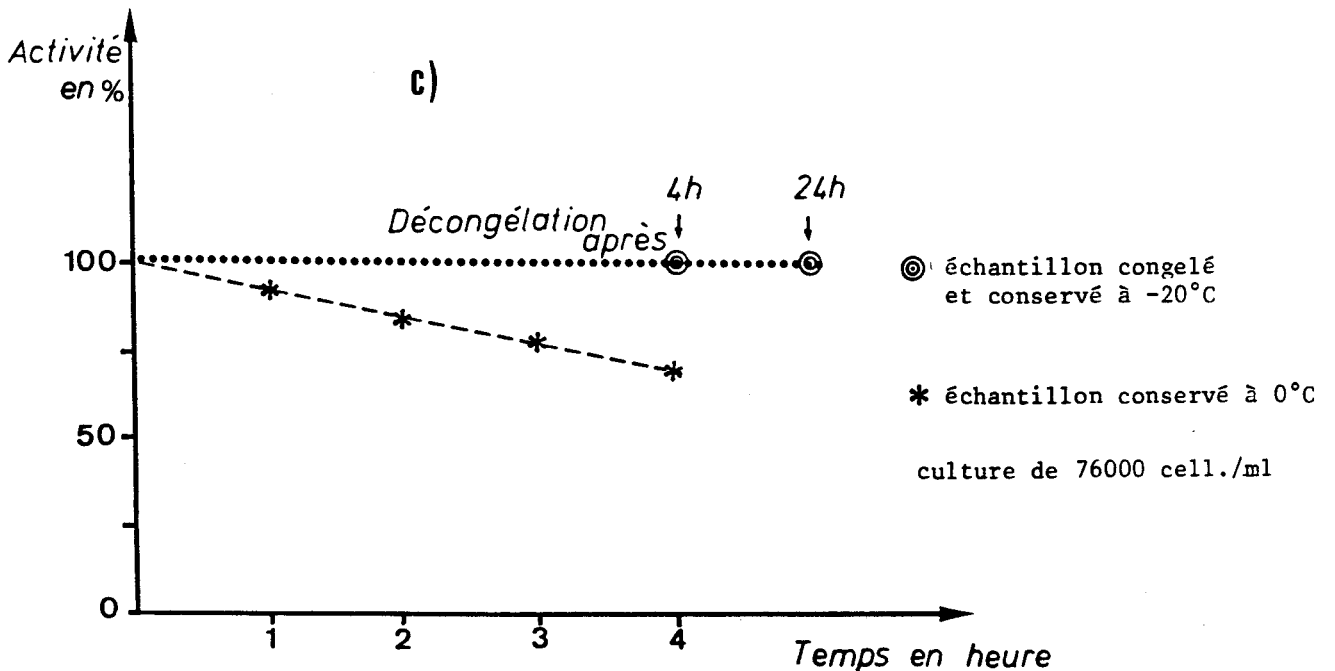
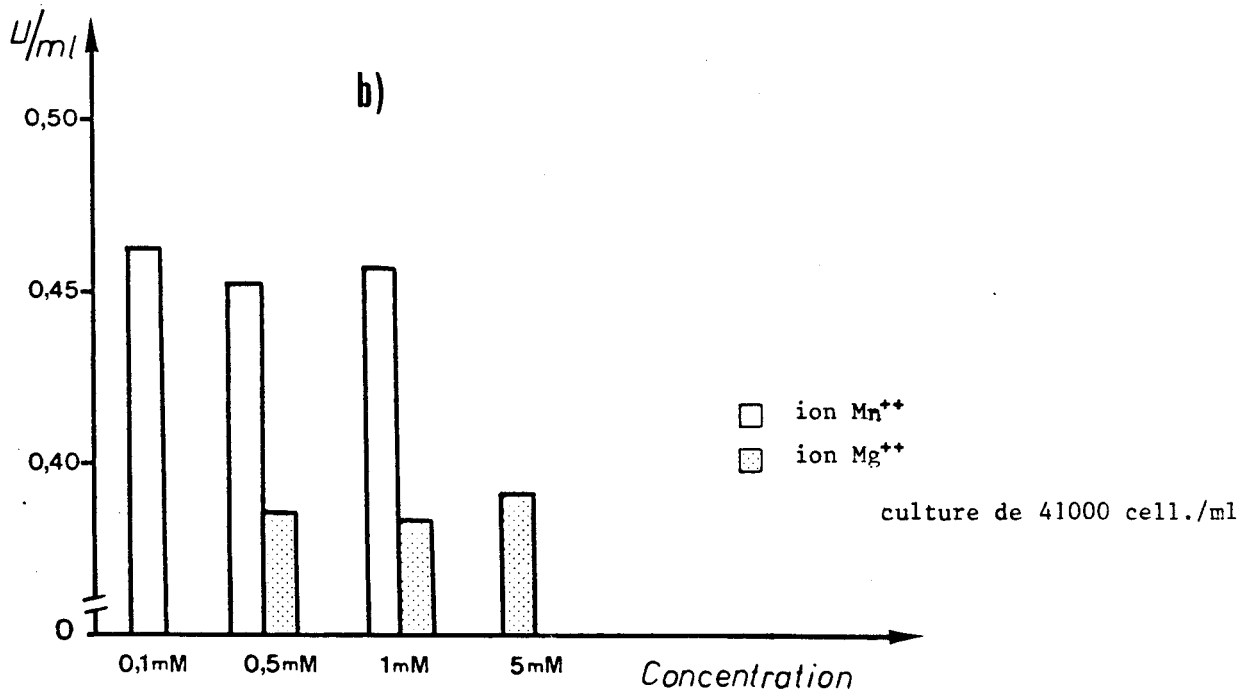
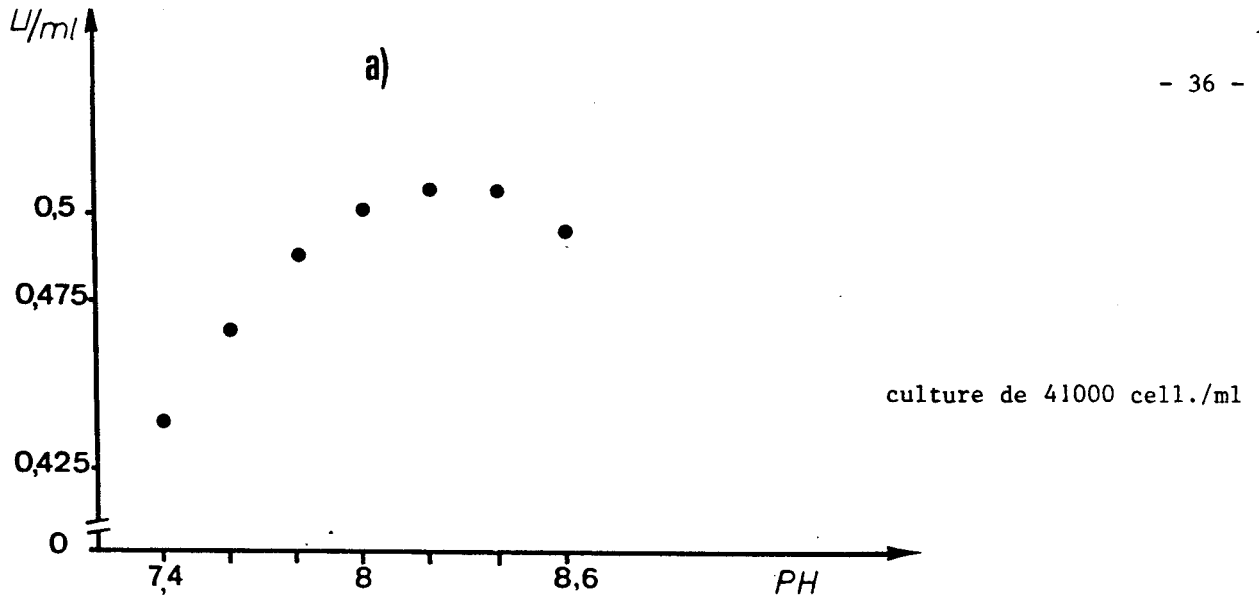


Figure 6 : Conditions optimales de dosage de l'IDH à NADP

95 %, à la fin du traitement de synchronisation, on aura respectivement $D_t = 64 D_0$ et $D_t = 55 D_0$.

Pour tempérer l'effet de ces fluctuations inévitables sur les données numériques, nous avons décidé d'utiliser le rapport $\frac{\text{activité au temps } t}{\text{activité au temps } 20 \text{ mn}}$ ou A/A_{20} pour suivre l'évolution des activités enzymatiques totales dans les cultures synchrones.

Il était impossible d'envisager une dilution dans du milieu pour obtenir une concentration cellulaire constante, des expériences nous ont, en effet, montré que l'inoculation dans un milieu neuf entraîne des phénomènes de régulation au niveau des enzymes que nous devons étudier.

Le tableau I, page 38, montre l'évolution de l'activité au cours du temps dans les cultures synchrones et dans les cultures en phase exponentielle de croissance.

Les premiers examens graphiques ont montré que l'augmentation de l'activité était de type exponentiel, ce qui indique une synthèse continue de l'enzyme dans les cultures. Nous avons donc transformé les données A/A_{20} selon la fonction $\log_2 A/A_{20} = f(t)$. Les résultats sont représentés sur la figure 7, page 39, et dans le tableau II, page 40.

Nous voyons que l'augmentation d'activité dans les cultures normales est bien de type exponentiel, l'intersection de la droite théorique avec l'axe des abscisses se fait pour une valeur très proche de la valeur théorique (13 mn au lieu de 20 mn) et l'activité double en 145 mn, soit 15 mn de moins que le temps de génération (160 mn).

En revanche, l'évolution de l'activité dans les cultures synchrones ne devient semblable à celle obtenue dans les cultures normales qu'à partir de la 100-120ème minute ; les pentes étant alors très similaires (11 % de

Tableau I : Evolution de l'activité (exprimée par le rapport A/A₂₀)
de l'IDH à NADP

Temps en mn	Cultures synchrones (7) [*]		Cultures exponentielles (2) [*]
	\bar{x}	V en % \bar{X}	\bar{X}
60'	\bar{x}		1,26
	s		
80'	\bar{x} 1,20	3,3	1,42
	s 0,04		
100'	\bar{x} 1,33	7,5	1,60
	s 0,10		
120'	\bar{x} 1,40	10,7	1,68
	s 0,15		
140'	\bar{x} 1,53	9,8	1,85
	s 0,15		
160'	\bar{x} 1,70	6,5	2,04
	s 0,11		
180'	\bar{x} 1,76	7,4	2,15
	x 0,13		
200'	\bar{x} 1,99	6,5	
	s 0,13		
220'	\bar{x} 2,11	3,3	
	s 0,07		
240'	\bar{x} 2,35	9,8	
	s 0,23		
260'	\bar{x} 2,58	5,4	
	s 0,14		
280'	\bar{x} 2,79	9,3	
	s 0,26		
300'	\bar{x} 3,04	5,6	
	s 0,17		

* le chiffre indiqué entre parenthèses indique le nombre d'expériences à partir desquelles ont été établis les moyennes et les écarts-types.

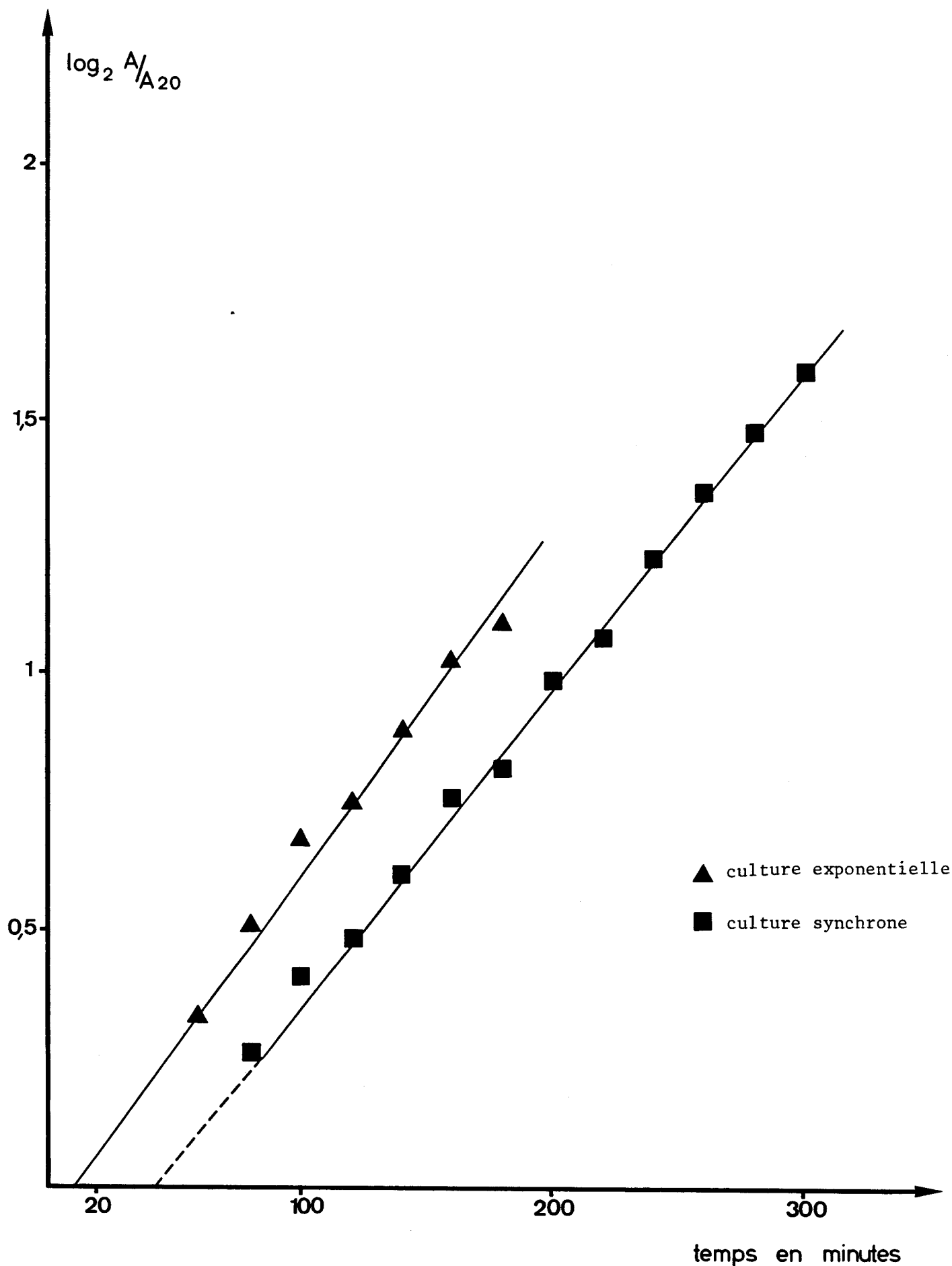


Figure 7 : Evolution de l'activité totale de l'IDH à NADP en fonction du temps dans les cultures exponentielles et les cultures synchrones de *Tetrahymena*

Tableau II : Etude des corrélations entre A/A_{20} et (t) pour l'IDH à NADP

	Cultures synchrones	Cultures exponentielles
Equation générale	$\log_2 A/A_{20} = 0,006205 t - 0,2597$	$\log_2 A/A_{20} = 0,006888 t - 0,079771$
Coefficient de corrélation (r)	0,998	0,993
Variation liée	0,997	0,987
Signification de la pente	$t = 50,7 \left(t = 5,04 \right)$ $8-1(0,001)$	$t = 21,3 \left(t = 5,96 \right)$ $6-1(0,001)$
Intervalle de confiance de la pente	$I_{c/0,05} = 0,000239$ $I_{c/0,01} = 0,000315$	$I_{c/0,05} = 0,000632$ $I_{c/0,01} = 0,000832$

différence). L'intersection de la droite avec l'axe des abscisses est très éloignée de la valeur théorique (42 mn) et montre que l'évolution de l'activité dans les cultures synchrones est particulière pendant les 60 à 80 minutes suivant la fin du traitement de synchronisation.

I.1.2.2. Activité spécifique (tableau III, page 42 ; figure 8, page 43)

Dans les cultures synchrones, l'activité spécifique augmente au cours des deux cycles cellulaires suivis. Un point de transition apparaît assez nettement à $t = 200$ mn, qui est le moment où la deuxième division s'amorce.

Par comparaison, dans les cellules normales (figure 9, page 44), l'augmentation de l'activité spécifique est très importante entre le départ de la culture et le moment où l'on atteint environ 150 000 cellules/ml. Ensuite, l'évolution est beaucoup plus lente. Les activités obtenues dans les cultures synchrones ont été reportées sur le même graphique et on voit qu'elles s'intègrent bien dans l'ensemble des points. Il n'y a donc pas de différence significative entre les deux types de culture, en ce qui concerne l'activité spécifique.

I.2. LA MALATE DESHYDROGENASE

I.2.1. Evolution de l'activité totale

Le tableau IV, page 45 et la figure 10, page 46, montrent l'évolution de l'activité de la malate déshydrogénase dans les cultures exponentielles et les cultures synchrones. Comme pour l'isocitrate déshydrogénase à NADP, l'évolution de l'activité est de type exponentiel. Les caractéristiques des droites de régression obtenues sont données dans le tableau V, page 47.

Dans les cultures normales, l'évolution est doublée toutes les 160 mn (durée du cycle). Dans les cultures synchronisées, on observe au départ un

Tableau III : Evolution de l'activité spécifique de l'IDH à NADP
au cours du cycle synchrone

Temps en mn (après la fin du dernier choc thermique)	Activité spécifique mU/mg de protéines (7)*		
	\bar{x} s		Ven % \bar{x}
20'	\bar{x} s	232 45	19,4
80'	\bar{x} s	259 51	19,7
100'	\bar{x} s	262 44	16,8
120'	\bar{x} s	269 48	17,8
140'	\bar{x} s	275 37	13,5
160'	\bar{x} s	272 25	9,2
180'	\bar{x} s	281 43	15,3
200'	\bar{x} s	285 32	11,2
220'	\bar{x} s	302 47	15,6
240'	\bar{x} s	320 46	14,4
260'	\bar{x} s	329 44	13,4
280'	\bar{x} s	337 50	14,8
300'	\bar{x} s	348 57	16,4

* Le chiffre indiqué entre parenthèses indique le nombre d'expériences à partir desquelles ont été établis les moyennes et les écarts-types.

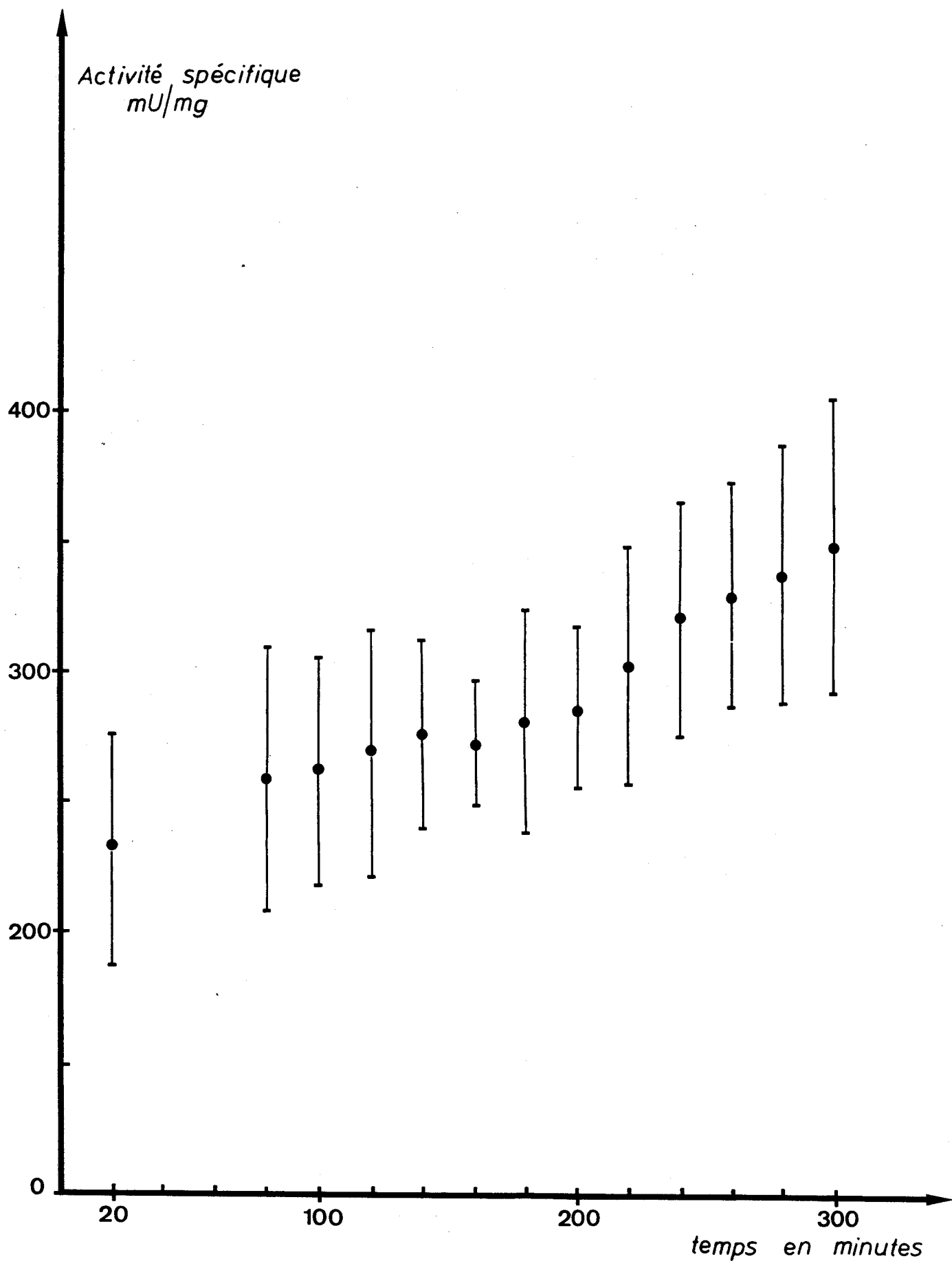


Figure 8 : Evolution de l'activité spécifique de l'IDH à NADP au cours du cycle synchrone

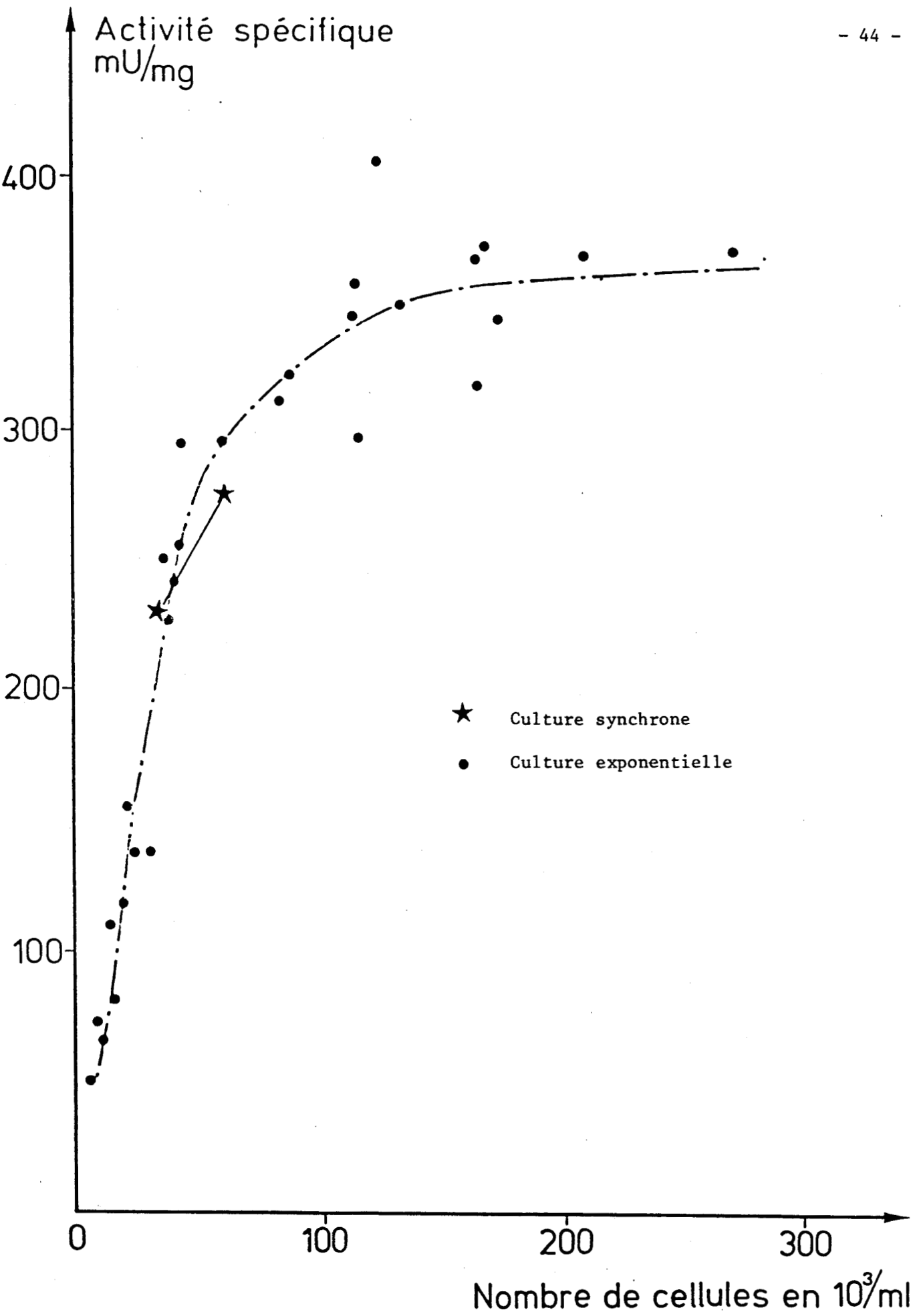


Figure 9 : Variation de l'activité spécifique de l'IDH à NADP en fonction du nombre de cellules en culture exponentielle

Tableau IV : Evolution de l'activité (exprimée par le rapport A/A_{20}) de la MDH

Temps en mn	Cultures synchrones (7)*		Cultures exponentielles (2)*
	\bar{x}	V en % \bar{X}	\bar{X}
60'	\bar{x}		1,25
	s		
80'	\bar{x} 1,28	7,8	1,36
	s 0,10		
100'	\bar{x} 1,51	7,9	1,51
	s 0,12		
120'	\bar{x} 1,63	11	1,65
	s 0,18		
140'	\bar{x} 1,82	8,8	1,80
	s 0,16		
160'	\bar{x} 2	8	1,85
	s 0,16		
180'	\bar{x} 2,12	10,4	2,04
	s 0,22		
200'	\bar{x} 2,37	8	
	s 0,19		
220'	\bar{x} 2,56	9,4	
	s 0,24		
240'	\bar{x} 2,73	11	
	s 0,30		
260'	\bar{x} 2,99	10	
	s 0,30		
280'	\bar{x} 3,27	10,7	
	s 0,35		
300'	\bar{x} 3,49	8,9	
	s 0,31		

* Le chiffre indiqué entre parenthèses indique le nombre d'expériences à partir desquelles ont été établis les moyennes et les écarts-types.

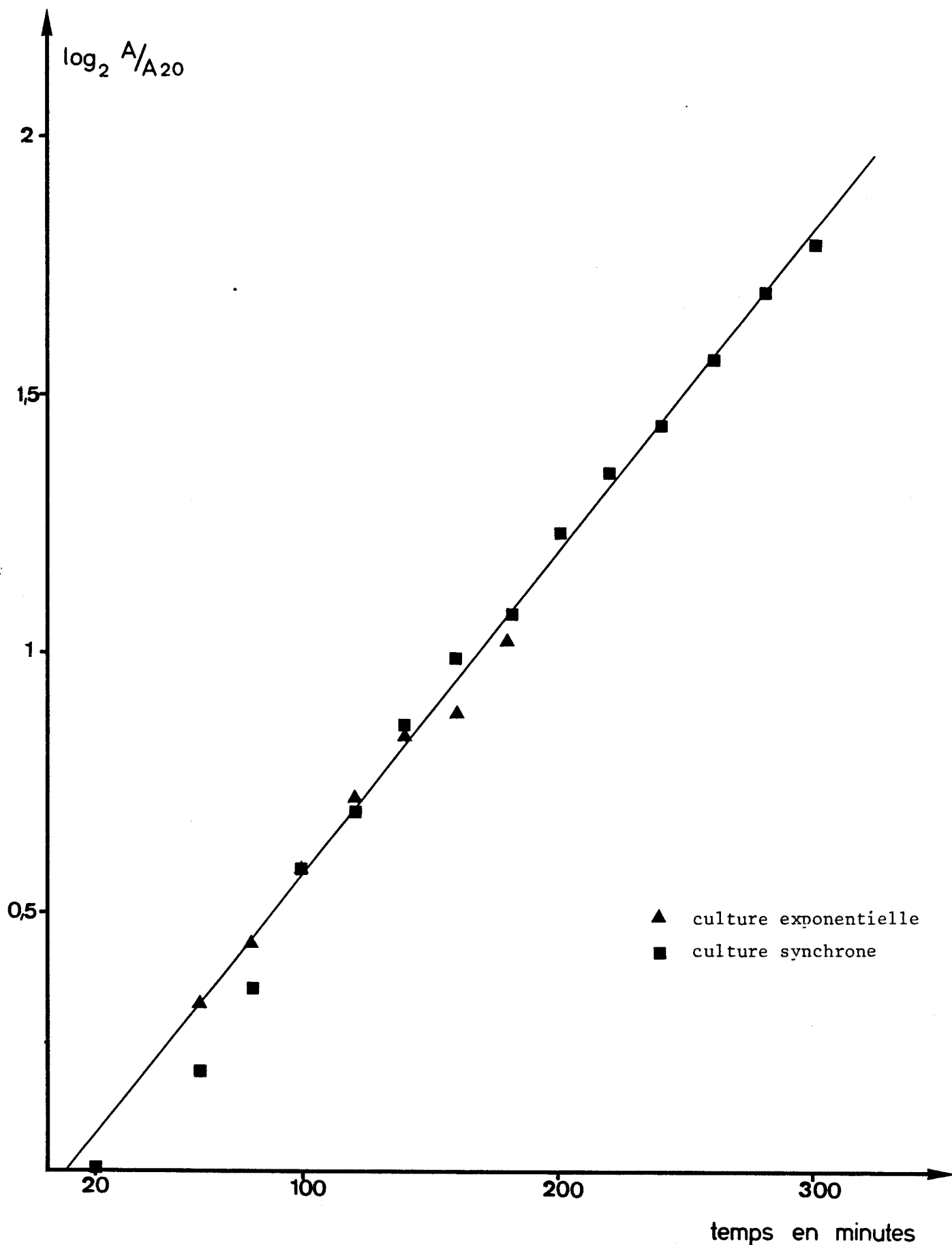


Figure 10 : Evolution de l'activité totale de la MDH en fonction du temps dans les cultures exponentielles et les cultures synchrones de *Tetrahymena*

Tableau V : Etude des corrélations entre A/A_{20} et (t) pour la MDH

	Cultures synchrones	Cultures exponentielles
Equation générale	$\log_2 A/A_{20} = 0,006355 t - 0,060042$	$\log_2 A/A_{20} = 0,006305 t - 0,072080$
Coefficient de corrélation (r)	0,998	0,993
Variation liée	0,996	0,986
Signification de la pente	$t = 50,3 \left(t = 4,58 \right)$ $10^{-1}(0,001)$	$t = 20,77 \left(t = 5,96 \right)$ $6^{-1}(0,001)$
Intervalle de confiance de la pente	$I_{c/0,05} = 0,000247$	$I_{c/0,05} = 0,000594$
	$I_{c/0,01} = 0,000326$	$I_{c/0,01} = 0,000783$

léger retard par rapport aux cultures de type exponentiel, mais la pente de la droite est très semblable ; ce retard est comblé à la 100ème minute et l'évolution des activités est alors rigoureusement identique.

I.2.2. Evolution de l'activité spécifique

(tableau VI, page 49 ; figures 11 et 12, pages 50 et 51). Dans les cultures synchrones, l'évolution de l'activité spécifique de la malate déshydrogénase est particulière. Deux accélérations sont constatées entre 80-100 mn et entre 200-220 mn. Ces deux augmentations correspondent au moment de l'apparition des premières cellules filles lors des deux divisions synchrones. Elles sont suivies de phases où la synthèse de l'enzyme se ralentit pour devenir semblable à celle des protéines totales. Nous verrons ultérieurement les différentes manières d'interpréter ces résultats.

Dans les cultures exponentielles, l'activité spécifique de la malate déshydrogénase est constamment croissante jusqu'au delà de 200 000 cellules/ml. Son évolution est différente de celle de l'isocitrate déshydrogénase à NADP qui atteint pratiquement son palier lorsque les cultures contiennent environ 100-150 000 cellules/ml.

II - EFFETS DU THIRAME SUR LA CROISSANCE ET SUR L'EVOLUTION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

II.1. EFFETS DU THIRAME SUR LA COURBE DE CROISSANCE

Des études antérieures ont montré la grande sensibilité de *Tetrahymena* à l'égard du thirame (32). Nous avons choisi une concentration de 1,25 µg/ml (la dose létale étant de 8 µg/ml). Le produit est ajouté dans la culture dans un volume d'acétone tel que le solvant n'ait aucun effet sur la culture synchrone (32).

Tableau VI : Evolution de l'activité spécifique de la MDH
au cours du cycle synchrone

Temps en mn (après la fin du dernier choc thermique)	Activité spécifique mU/mg de protéines (7) [*]		
			Ven % \bar{X}
20'	\bar{x}	2860	9,8
	s	279	
80'	\bar{x}	3323	21,3
	s	708	
100'	\bar{x}	3775	14
	s	528	
120'	\bar{x}	3889	14,4
	s	559	
140'	\bar{x}	4096	13
	s	532	
160'	\bar{x}	4006	9,3
	s	374	
180'	\bar{x}	4126	16,9
	s	697	
200'	\bar{x}	4165	8,5
	s	352	
220'	\bar{x}	4533	14,3
	s	649	
240'	\bar{x}	4577	13,2
	s	605	
260'	\bar{x}	4718	10,4
	s	489	
280'	\bar{x}	4649	7,3
	s	338	
300'	\bar{x}	4711	9,4
	s	442	

* Le chiffre indiqué entre parenthèses indique le nombre d'expériences à partir desquelles ont été établis les moyennes et les écarts-types.

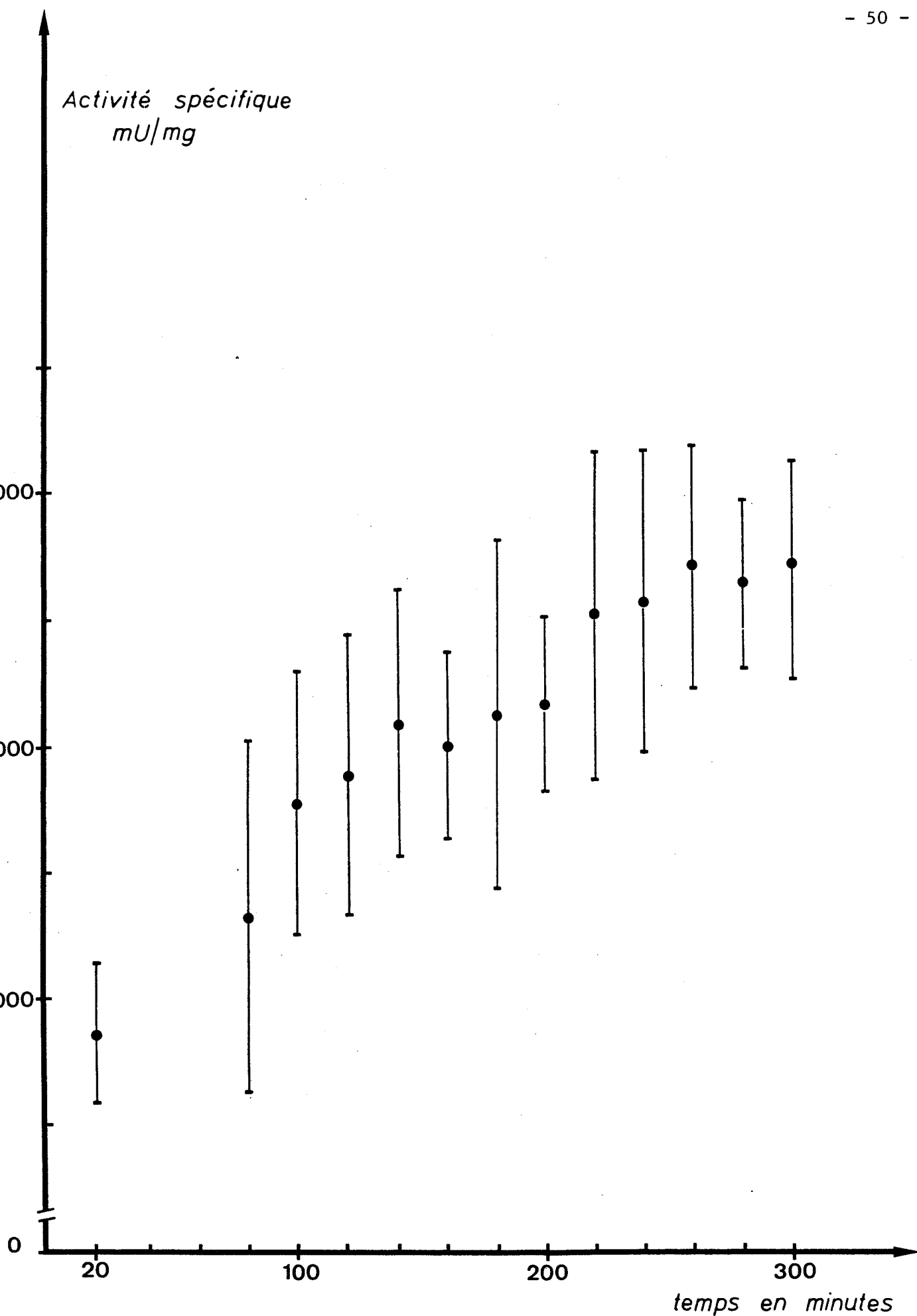


Figure 11 : Evolution de l'activité spécifique de la MDH au cours du cycle synchrone

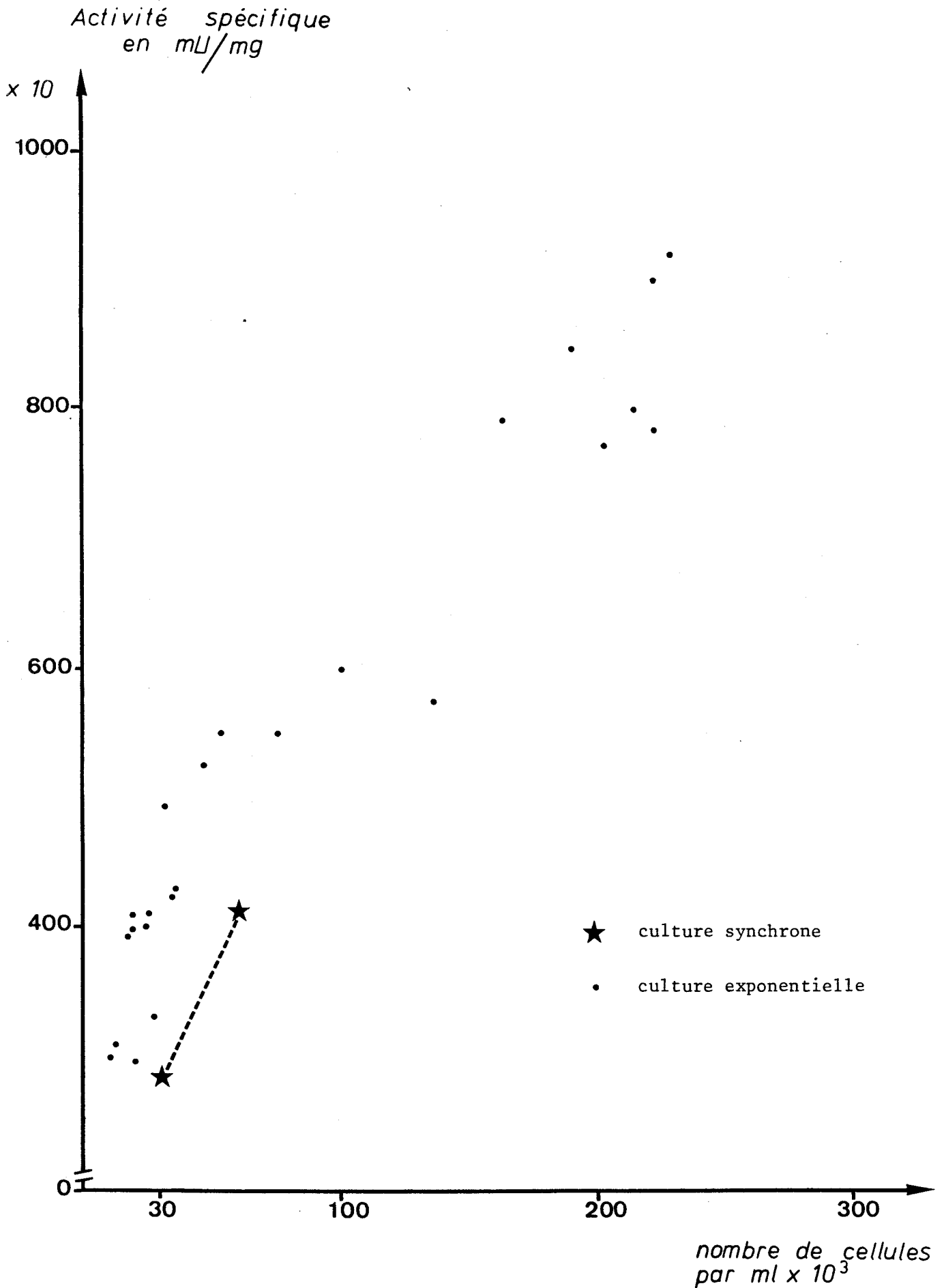


Figure 12 : Variation de l'activité spécifique de la MDH en fonction du nombre de cellules en culture exponentielle

Nous avons injecté le toxique en deux points du cycle synchrone. Dans une première série d'expériences au temps t_{10} (soit 10 mn après la fin du traitement thermique), dans une seconde série au temps t_{90} , c'est-à-dire au début de la première division.

Additionné à t_{10} , 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de thirame inhibe temporairement la division synchrone qui s'effectue avec près de 4 heures de retard. Ajouté à t_{90} , le TMTD bloque totalement la division qui débute et entraîne progressivement la mort des ciliés 170 minutes plus tard.

II.2. EFFET DU THIRAME SUR L'ACTIVITE DE LA MDH ET DE L'IDH

Le thirame bloque totalement l'évolution de l'activité de la MDH, quel que soit le moment de l'ajout : t_{10} ou t_{90} (figure 13a, page 53). L'isocitrate déshydrogénase à NADP par contre, présente, pour le premier temps d'addition, une activité identique à celle du témoin jusqu'à la 120^{ème} minute, puis son évolution ralentit par rapport à celle du témoin pour se stabiliser vers la 180^{ème} minute du cycle (figure 13b, page 53).

Cependant, si le produit est administré au moment de la division, on observe un arrêt immédiat de l'évolution de l'activité.

III - ETUDE DES EFFETS DE LA CYCLOHEXIMIDE ET DE L'ACTINOMYCINE D

III.1. ACTION SUR L'EVOLUTION DE LA POPULATION

La cycloheximide (10 $\mu\text{g/ml}$) bloque totalement et immédiatement la division cellulaire quand elle est ajoutée dans les cultures exponentielles comme dans les cultures synchrones. L'actinomycine D (50 $\mu\text{g/ml}$), ajoutée dans les cultures exponentielles, bloque également la multiplication mais

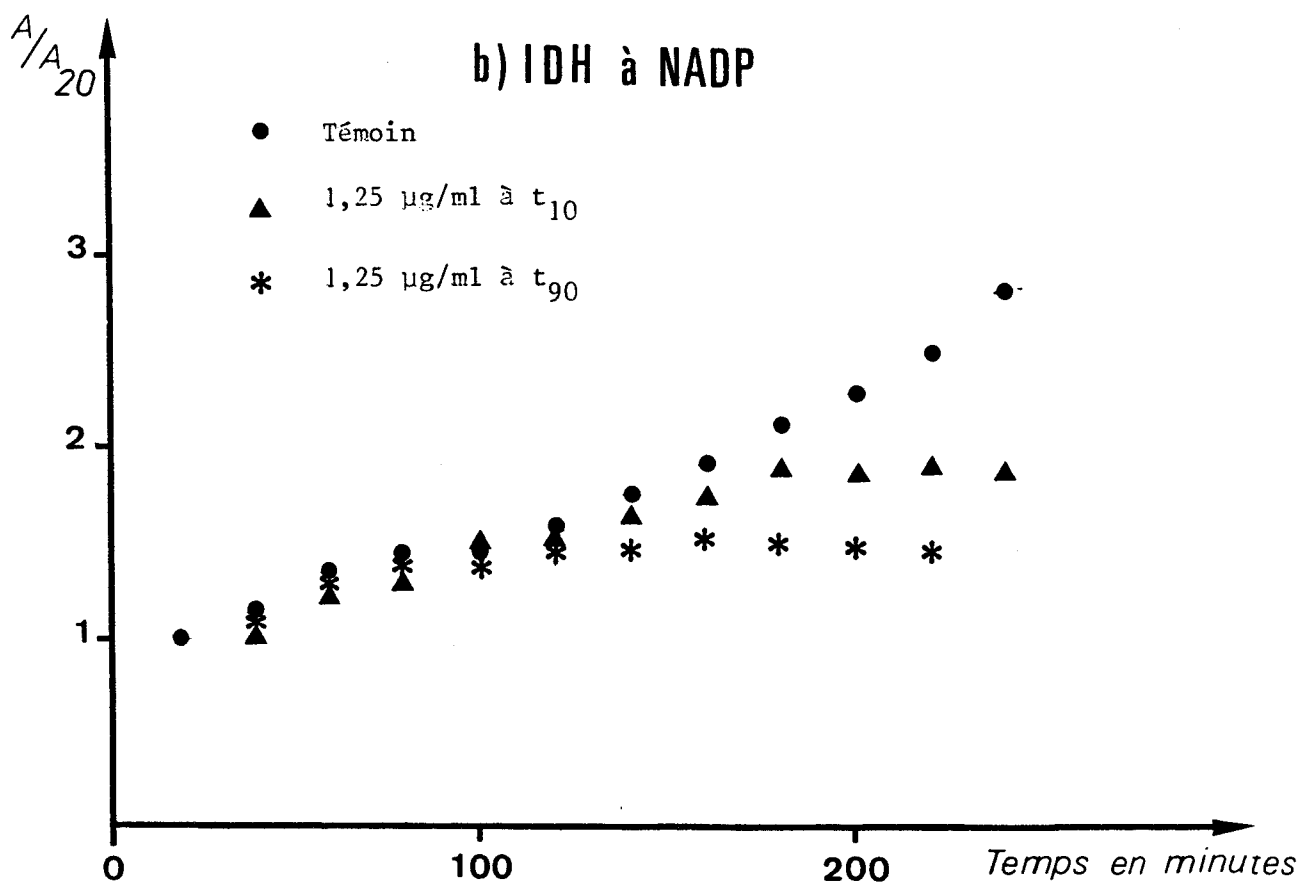
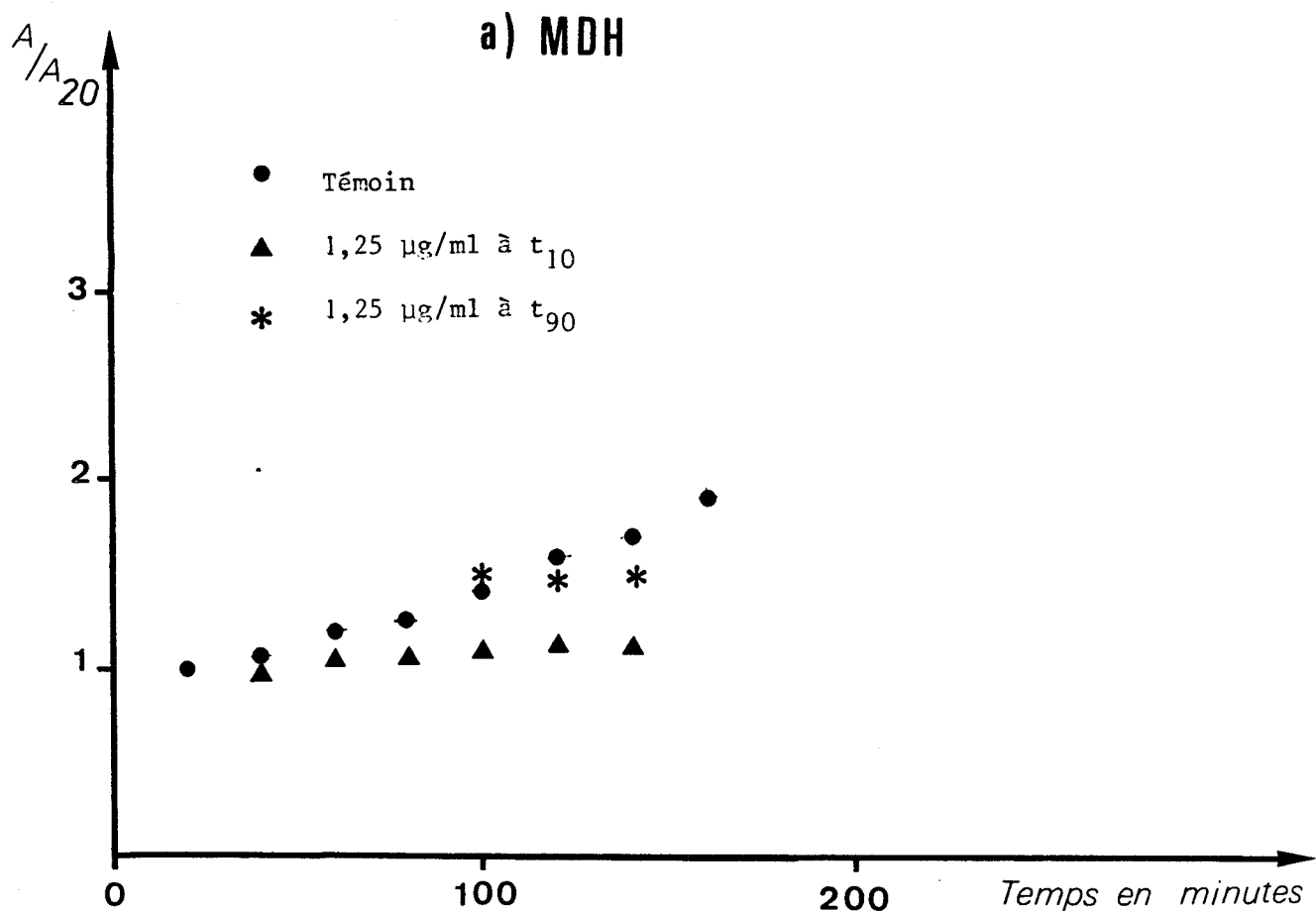


Figure 13 : Action du thirame sur l'activité (exprimée par le rapport A/A_{20}) de la MDH et de l'IDH au cours du cycle synchrone

7 à 10 % des cellules terminent leur division après l'addition du produit. Dans les cultures synchrones, jusqu'à la 60ème minute, l'addition d'actinomycine D bloque la première division (figure 14, page 55). Ajoutée entre la 80ème et la 120ème minute, le produit ne peut empêcher la division d'une partie de la population, le pourcentage de cellules qui se divisent est d'autant plus faible que l'addition est précoce. Au temps 140 minutes et au delà, l'addition du toxique est effectuée pendant le plateau et on constate alors un blocage de la seconde division.

III.2. ACTION SUR L'EVOLUTION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DANS LES CULTURES

III.2.1. Expression des résultats

Les deux produits exercent un effet très différent (figure 15, page 56). La cycloheximide bloque immédiatement l'évolution de l'activité enzymatique dans les cultures.

En présence d'actinomycine D, en revanche, l'évolution de l'activité se poursuit pendant un certain temps d'une manière identique à celle du témoin, pour s'arrêter ensuite progressivement ou brutalement selon les cas. L'augmentation d'activité se produit alors même que l'incorporation d'uridine marquée, dans la fraction TCA précipitable, est totalement bloquée (figure 16, page 57).

Pour l'interprétation des résultats, nous avons donc pris en compte deux paramètres :

- La période pendant laquelle l'activité évoluait dans la culture traitée au même rythme que dans la culture témoin. Nous l'avons déterminée en étudiant l'évolution du rapport $R_A = \frac{\text{Activité dans la culture traitée}}{\text{Activité dans la culture témoin}}$.

Quand on ajoute l'actinomycine D, ce rapport reste constant autour de 1 (quelquefois au dessus, quelquefois en dessous) pendant une certaine durée, puis il diminue régulièrement sans jamais remonter. C'est le point où cette

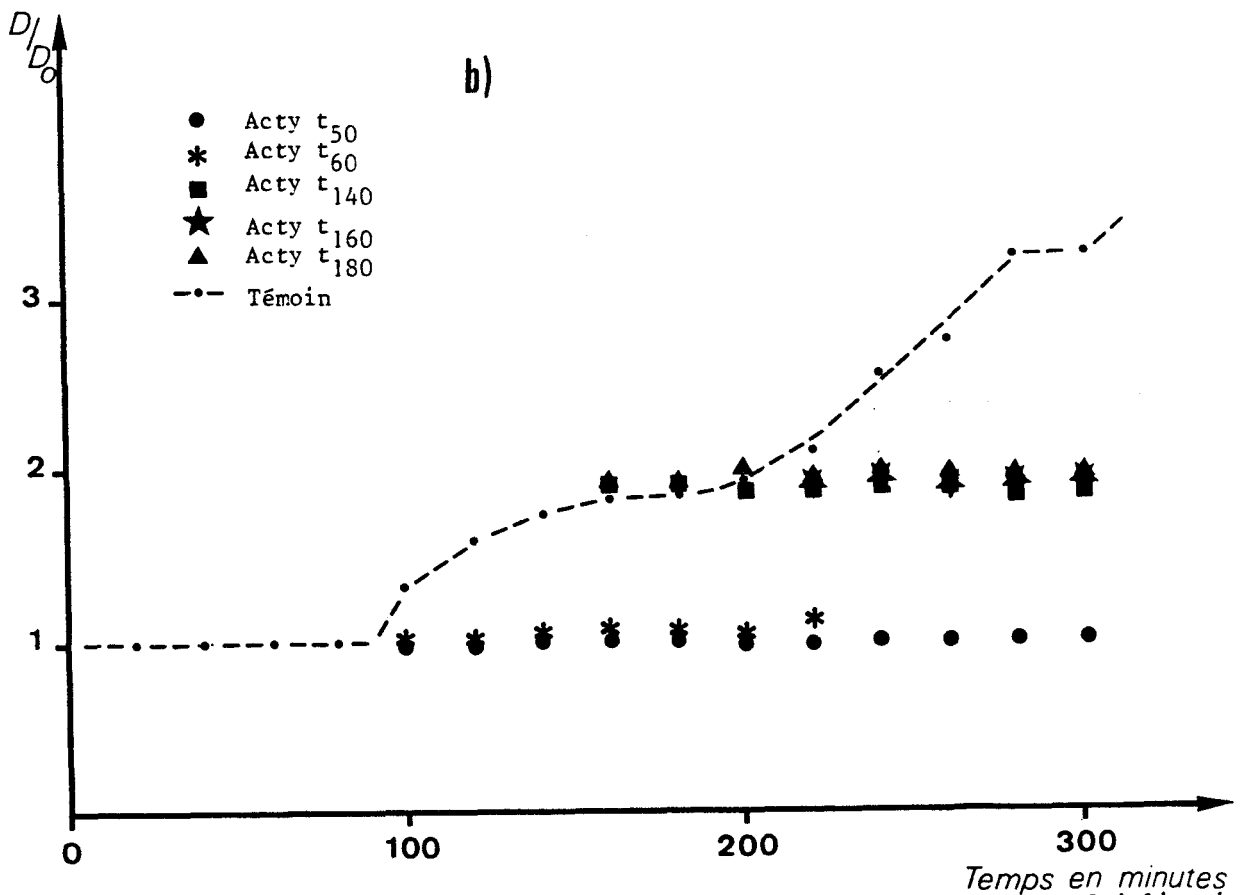
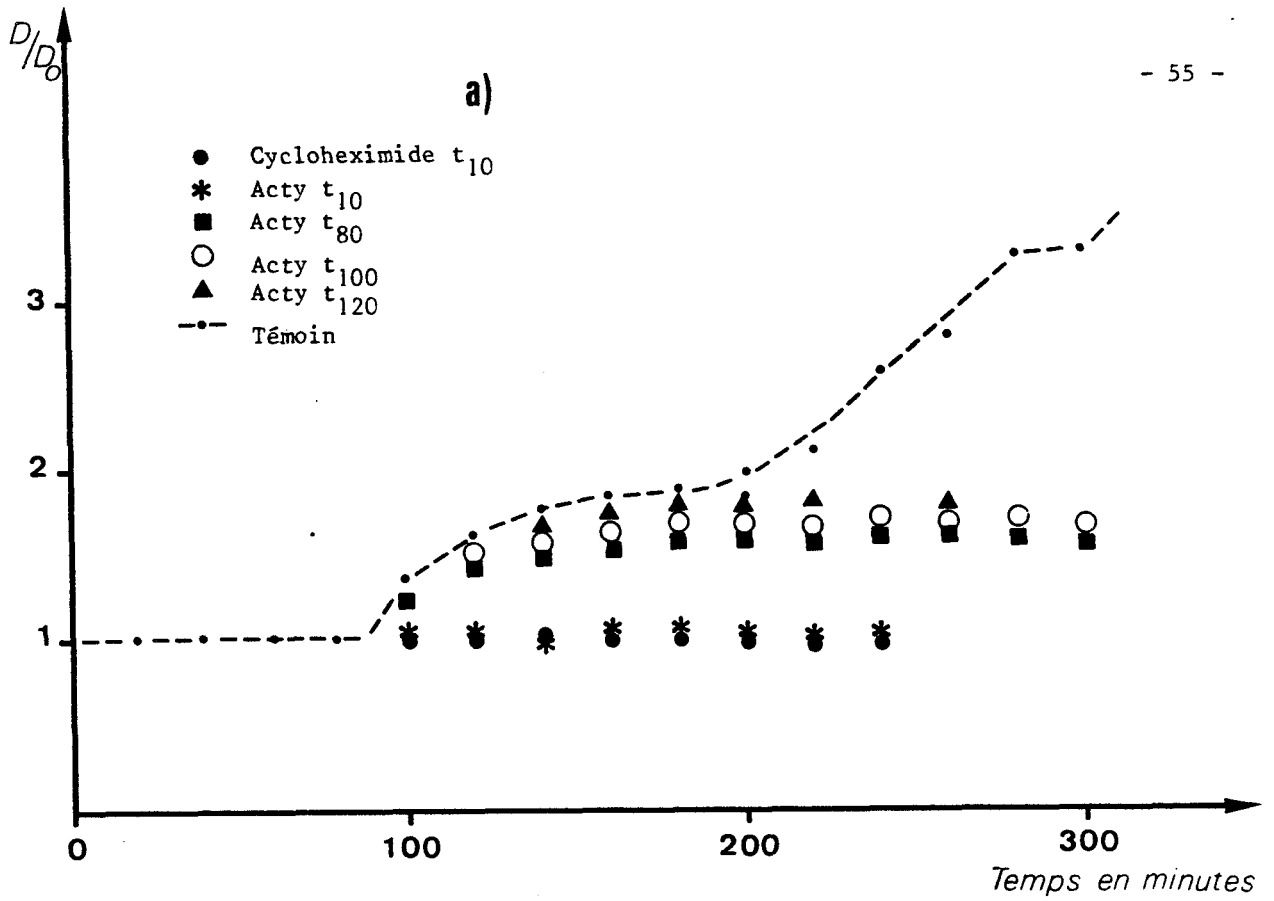
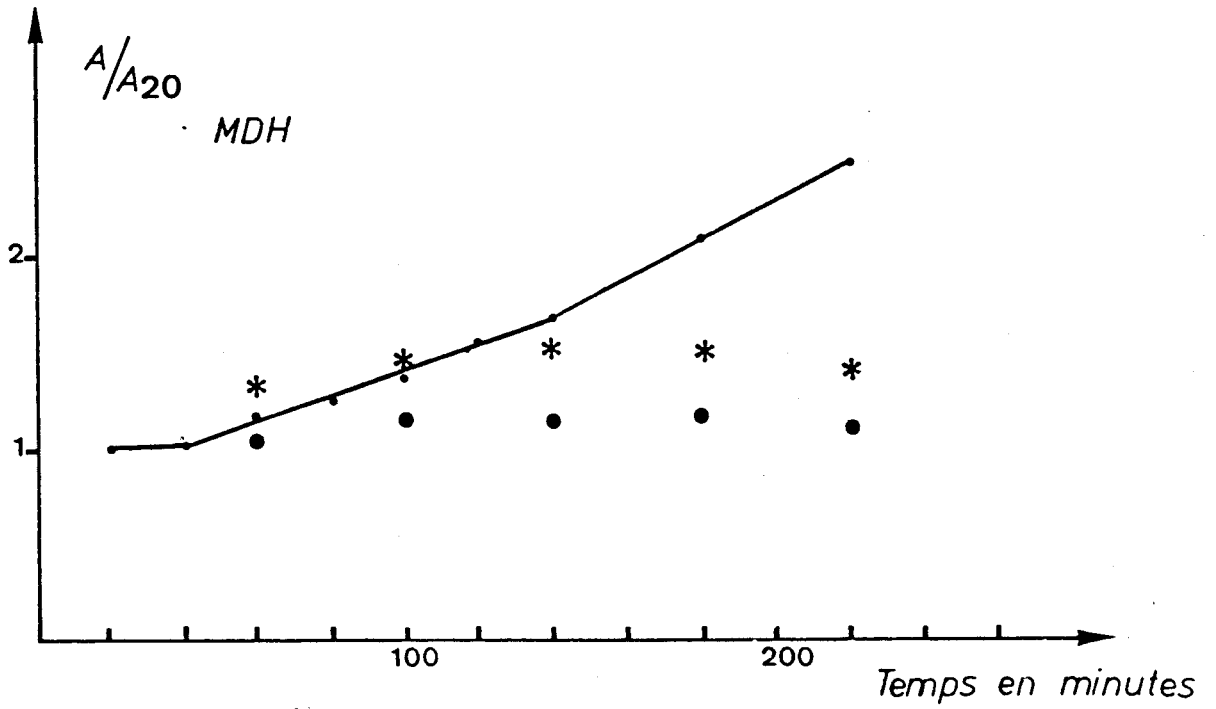


Figure 14 : Action de la cycloheximide et de l'actinomycine D sur la multiplication cellulaire au cours du cycle en fonction du moment d'addition



* Actinomycine D à t_{10}

● Cycloheximide à t_{10}

--- Témoin

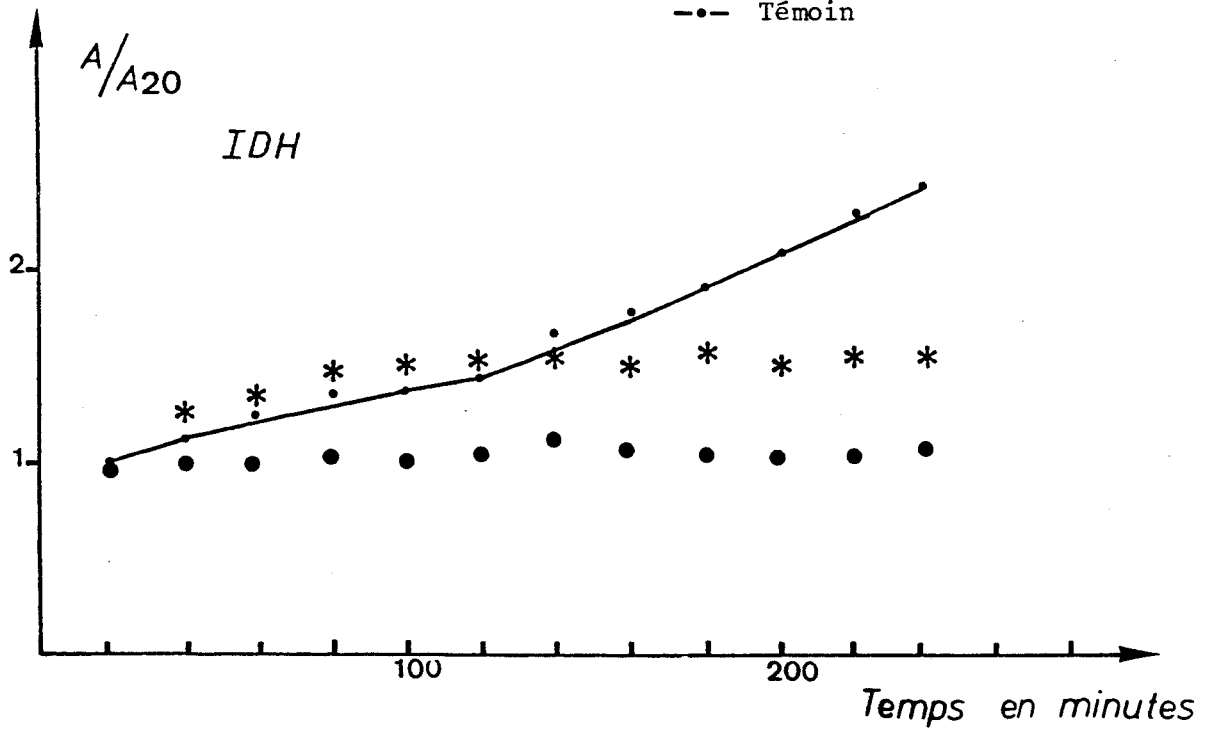


Figure 15 : Action de la cycloheximide et de l'actinomycine D sur l'activité (exprimée en A/A_{20}) de la MDH et de l'IDH au cours du cycle synchrone.

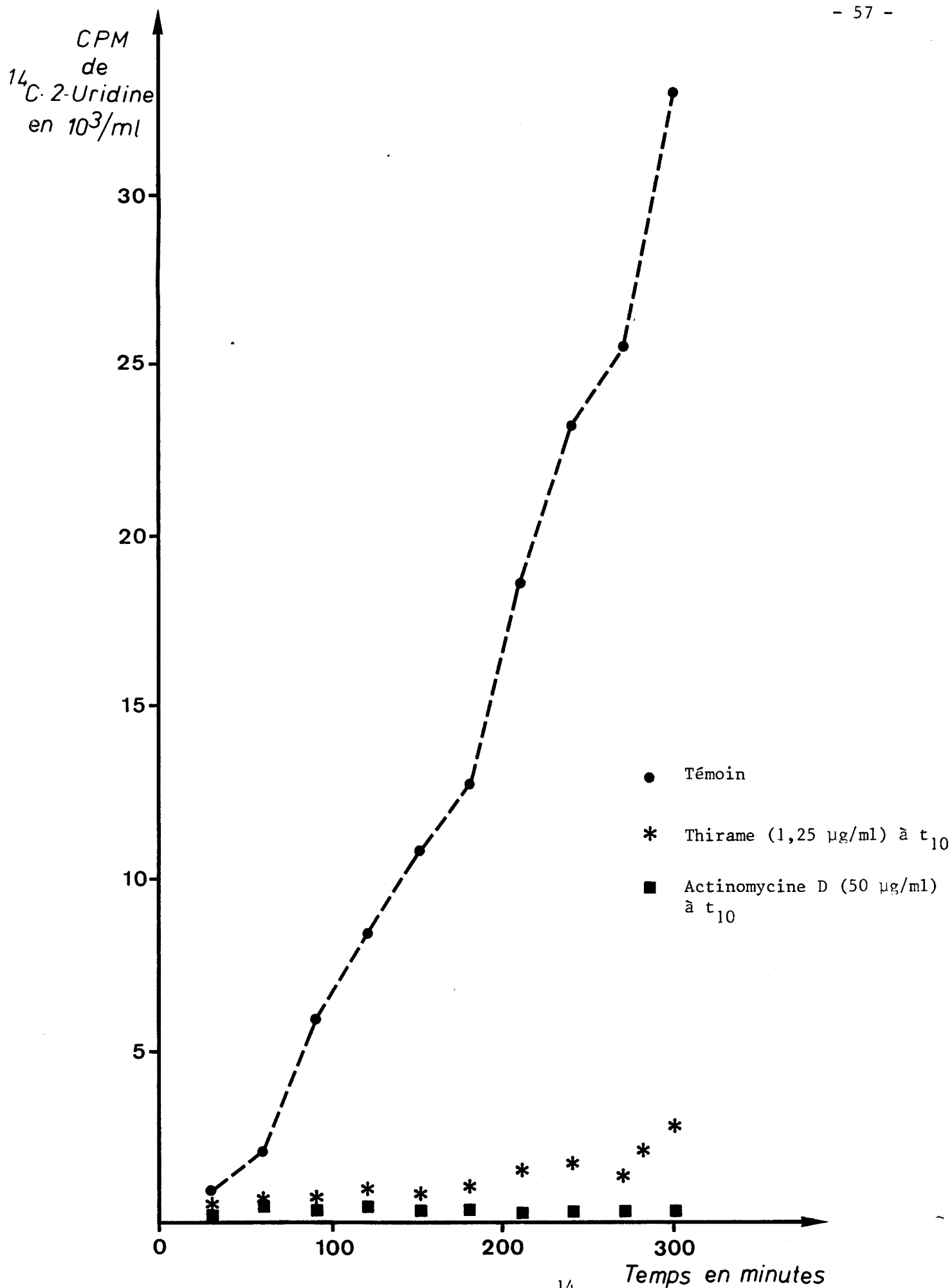


Figure 16 : Incorporation d'uridine ^{14}C en présence de thirame et d'actinomycine D au cours du cycle synchrone

chute irréversible s'amorce, qui définit la fin de la période d'évolution équivalente dans les deux cultures.

- La manière (brutale ou progressive) dont l'évolution de l'activité s'arrête dans la culture traitée.

III.2.2. Action de la cycloheximide et de l'actinomycine D sur l'évo-

lution des activités enzymatiques dans les cultures en phase exponen-

tielle de croissance

En présence de cycloheximide, la valeur du rapport R_A diminue prati-
quement sans délai, résultat prévisible si l'on sait que l'évolution de
l'activité est immédiatement bloquée par la drogue (tableau VII, page 59).
En présence d'actinomycine D (tableau VII, page 59) l'évolution de l'activité
enzymatique est identique à celle du témoin pendant 60 minutes pour l'isocitra-
te déshydrogénase à NADP et pendant 80 minutes pour la malate déshydrogénase.
L'évolution de l'activité ralentit ensuite progressivement.

III.2.3. Action de la cycloheximide et de l'actinomycine D sur l'évo-

lution de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase à NADP dans les

cultures synchrones

III.2.3.1. Cultures synchrones normales

La cycloheximide exerce une action inhibitrice immédiate sur l'acti-
vité.

Les résultats obtenus avec l'actinomycine D sont regroupés dans le
tableau VIII, page 60, et dans la figure 17, page 61, où nous avons représen-
té, en fonction du moment d'addition de la drogue, la période pendant laquelle

Tableau VII : Valeurs de R_A obtenues pour l'isocitrate déshydrogénase et la malate déshydrogénase en culture exponentielle

R_A / Temps	20'	40'	60'	80'	100'	120'	140'	160'	180'
IDH	Cyclo.	1,03 (2)	0,84 (2)	0,78 (2)	0,78 (2)	0,64 (2)	0,56 (2)	0,56 (2)	
	Acty.	1,07 (2)	1,06 (2)	1 (2)	0,93 (2)	0,92 (2)	0,85 (2)	0,78 (2)	0,73 (2)
MDH	Cyclo.	1,03 (2)	0,79 (2)	0,78 (2)	0,77 (2)	0,58 (2)	0,56 (2)	0,53 (2)	
	Acty.	1,07 (2)		1,05 (2)	1,01 (2)	0,97 (2)	0,86 (2)	0,86 (2)	0,77 (2)

Le chiffre entre parenthèses indique le nombre d'expériences à partir desquelles ont été établies les moyennes.

Tableau VIII : Valeurs de R_A obtenues pour l'isocitrate déshydrogénase à NADP au cours du cycle synchrone

temps en mn R_A	20'	40'	60'	80'	100'	120'	140'	160'	180'	200'	220'	240'	260'	280'	300'	320'
Cycloheximide	0,92(2)	0,90(2)	0,88(2)	0,86(2)	0,80(2)	0,79(2)	0,70(2)	0,62(2)	0,58(2)	0,53(2)	0,48(2)	0,46(2)				
Acty t ₁₀	1,05(3) +0,09	1,09(3) +0,15	1,04(3) +0,02	1,08(3) +0,04	1,03(3) +0,08	1,02(3) +0,02	0,92(3) +0,08	0,84(3) +0,06	0,83(3) +0,11	0,73(3) +0,06	0,68(3) +0,08	0,63(3) +0,01				
Acty 50'	1,06(2)		1,09(2)	1,02(2)	1,01(2)	1,06(2)	0,97(2)	0,81(2)	0,82(2)	0,73(2)	0,65(2)					
Acty 60'	1,02(4) +0,06		1,02(4) +0,05	1,02(3) +0,07	1 (5) +0,03	0,96(4) +0,02	0,90(5) +0,05		0,78(4) +0,07		0,72(3) +0,02					
Acty 80'	1,05(2)			1 (2)	0,96(2)	1 (2)	0,95(3) +0,04	0,89(3) +0,02	0,89(3) +0,011	0,83(3) +0,06	0,76(3) +0,05	0,74(2)	0,69(2)	0,63(2)	0,59(2)	
Acty 100'	1,01(2)			1,04(2)	0,99(2)	1 (2)	1,04(2)	1 (2)	1 (2)	0,94(2)	0,94(2)	0,91(2)	0,81(2)	0,78(2)	0,72(2)	
Acty 120'	1,04(3) +0,05		1,05(2)			1,02(3) +0,05	1,03(4) +0,05	1,05(4) +0,07	1,07(4) +0,08	0,99(3) +0,15	0,94(3) +0,05		0,89(2)	0,87(2)		
Acty 140'	1,06(2)			1 (2)	1,07(2)	1,03(2)	1,01(2)	1,02(2)	1,09(2)	1,05(2)	0,98(2)	0,93(2)	0,94(2)	0,81(2)	0,81(2)	
Acty 160'	1 (2)			1,02(2)				1,02(2)	1,04(2)	1 (2)	0,98(3) +0,03	1,03(3) +0,08	0,90(3) +0,08	0,93(2)	0,81(2)	0,74(2)
Acty 180'	1,05(2)	1,06(2)			1,08(2)			1,01(2)	1,01(2)		1,05(2)	1,02(2)	1,01(2)	1 (2)	0,90(2)	0,86(2)

Le chiffre entre parenthèses indique le nombre d'expériences à partir desquelles ont été établis les moyennes et les écarts-types.

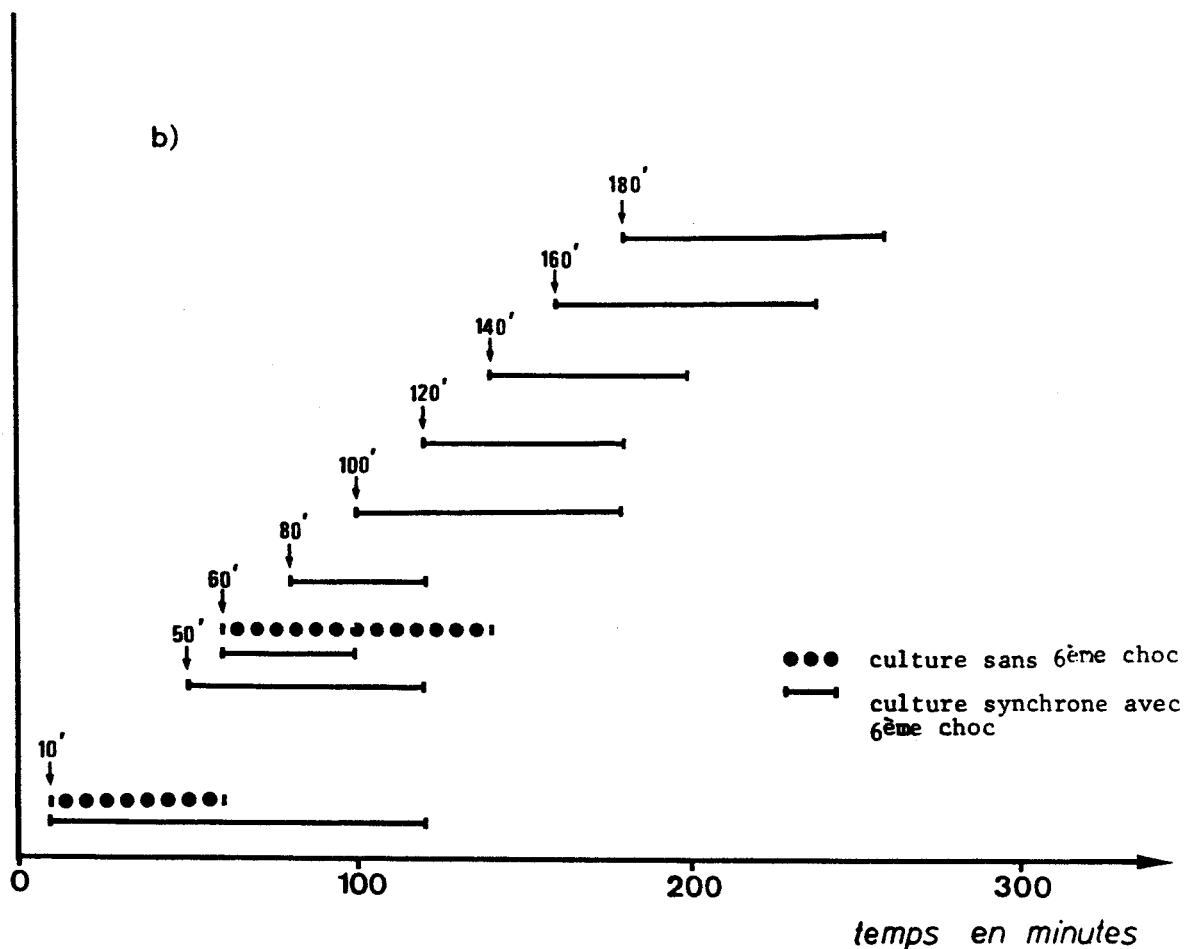
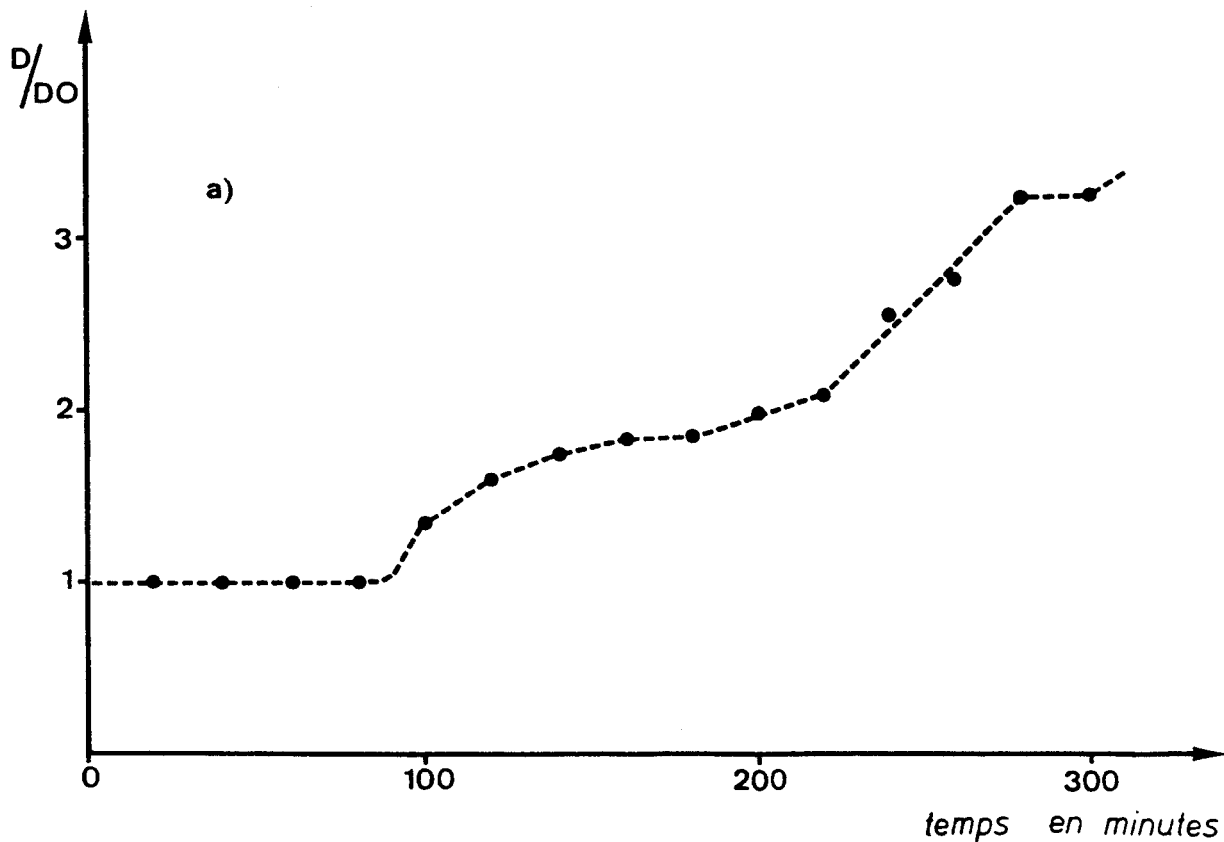


Figure 17 : a) Evolution de la population au cours du cycle
 b) Diagramme des durées pendant lesquelles les RA ≥ 1 en fonction du moment d'addition de l'actinomycine D au cours du cycle pour l'IDH

l'évolution de l'activité enzymatique s'effectue à un rythme identique à celui de la culture témoin. Il apparaît nettement que quel que soit le moment où l'actinomycine D est ajoutée entre 10 et 60 minutes après la fin du traitement de synchronisation :

- . le point de rupture entre témoin et culture traitée se situe entre 100 et 120 minutes ;
- . l'arrêt de l'évolution de l'activité est brutal dès que le point de rupture est atteint.

Si l'on ajoute l'actinomycine D à 80 minutes :

- . le point de rupture se situe toujours à 120 minutes ;
- . l'arrêt de l'évolution de l'activité n'est plus brutal mais progressif.

Entre 100 et 180 minutes, l'addition de l'actinomycine D permet d'observer les résultats suivants :

- . le point de rupture avec le témoin se situe entre 60 et 80 minutes après l'addition de la drogue ;
- . l'arrêt de l'évolution de l'activité est toujours progressif.

III.2.3.2. Cultures synchrones n'ayant pas subi de 6ème choc thermique

Si l'on supprime le 6ème choc thermique et que l'on ajoute l'actinomycine D à des temps correspondant respectivement à t_{10} et t_{60} d'une culture synchrone normale, on observe les résultats suivants (tableau IX, page 63 ; figure 17, page 61).

Tableau IX : Valeurs de R_A obtenues pour l'isocitrate déshydrogénase à NADP en culture synchrone en l'absence du sixième choc thermique
(Valeurs obtenues à partir de deux expériences)

R_A \ Temps	20'	40'	60'	80'	100'	120'	140'	160'	180'	200'
Actinomycine t_{10}	1,02	1,05	1,03	0,95	0,89	0,78	0,78	0,77		
Actinomycine D t_{60}	1,10	1,10	1,07	1,06	1,11	1,04	1,02	0,99	0,92	0,88

Les points de rupture avec le témoin se situent respectivement à 60 minutes et 100 minutes après l'addition du produit ajouté à t_{10} et t_{60} .

III.2.4. Action de la cycloheximide et de l'actinomycine D sur

l'évolution de l'activité de la malate déshydrogénase dans les

cultures synchrones

La cycloheximide bloque pratiquement immédiatement l'évolution de l'activité de la MDH.

En présence d'actinomycine D, l'activité de la MDH se distingue de celle de l'IDH à NADP par les points suivants (tableau X, page 65 ; figure 18 page 66) :

. A partir de $t = 50$ mn et jusque 180 mn, le point de rupture avec le témoin se situe environ 80 minutes après le moment où l'actinomycine D a été ajouté dans le milieu.

. Pour le temps $t = 10$ mn, le délai est plus court (50 mn).

. L'arrêt de l'évolution de l'activité est toujours progressif.

Si les cultures ne subissent pas de 6ème choc, l'évolution de l'activité enzymatique dans les cultures traitées (tableau XI, page 67) diverge de celle du témoin environ 80 mn après l'addition du produit.

Tableau X : Valeurs de R_A obtenues pour la malate déshydrogénase au cours du cycle synchrone.

Temps en mn R_A	20'	40'	60'	80'	100'	120'	140'	160'	180'	200'	220'	240'	260'	280'	300'	320'
Cycloheximide	1,12(2)		0,89(2)		0,76(2)		0,65(2)		0,56(2)		0,46(2)					
Acty t ₁₀	1,09(2)		1,04(2)		0,96(3) +0,03		0,84(2)		0,72(2)		0,56(2)					
Acty 50'	1,04(2)		1,07(2)	1,03(2)		1 (2)	0,95(2)	0,83(2)	0,82(2)	0,81(2)	0,76(2)					
Acty 60'	1,02(3) +0,03		1,01(4) +0,05	0,98(2)	1 (4) +0,02	1,04(3) +0,08	1 (2)		0,91(3) +0,06		0,81(4) +0,008					
Acty 80'	1,07(2)			1,01(2)	0,96(2)		1 (2)	1,02(2)	1 (2)	0,91(3) +0,08	0,85(2)	0,87(2)	0,80(2)	0,78(2)	0,68(2)	
Acty 100'	1,05(2)			1 (2)	0,97(2)	0,99(2)	1,01(2)	1,01(2)	1,05(2)	0,99(2)	0,96(2)	0,92(2)	0,86(2)	0,86(2)	0,80(2)	
Acty 120'	1 (3) +0,08				1,11(3) +0,05	1,04(2)	1,04(3) +0,03	1,14(2)	1 (2)	1,06(3) +0,13	0,98(3) +0,15			0,97(2)	0,98(2)	
Acty 140'	1,04(2)				1,05(2)	1,01	1,04	1,04(2)	1,01	1,07(2)	1,04(2)	0,95(2)	0,96(2)	0,91(2)	0,83(2)	
Acty 160'	1,12(2)			1 (2)				0,93(2)	1,08(2)	0,96(2)	1 (2)	1 (2)	0,93(3) +0,06	0,95(2)	0,88(2)	0,82(2)
Acty 180'	1,12(2)				1,09(2)			1,01(2)	1,06(2)	1,02(2)	1 (2)	1,02(2)	1	0,96(2)	0,91(2)	0,91(2)

(Le chiffre entre parenthèse indique le nombre d'expériences à partir desquelles ont été établis les moyennes et les écarts-types.)

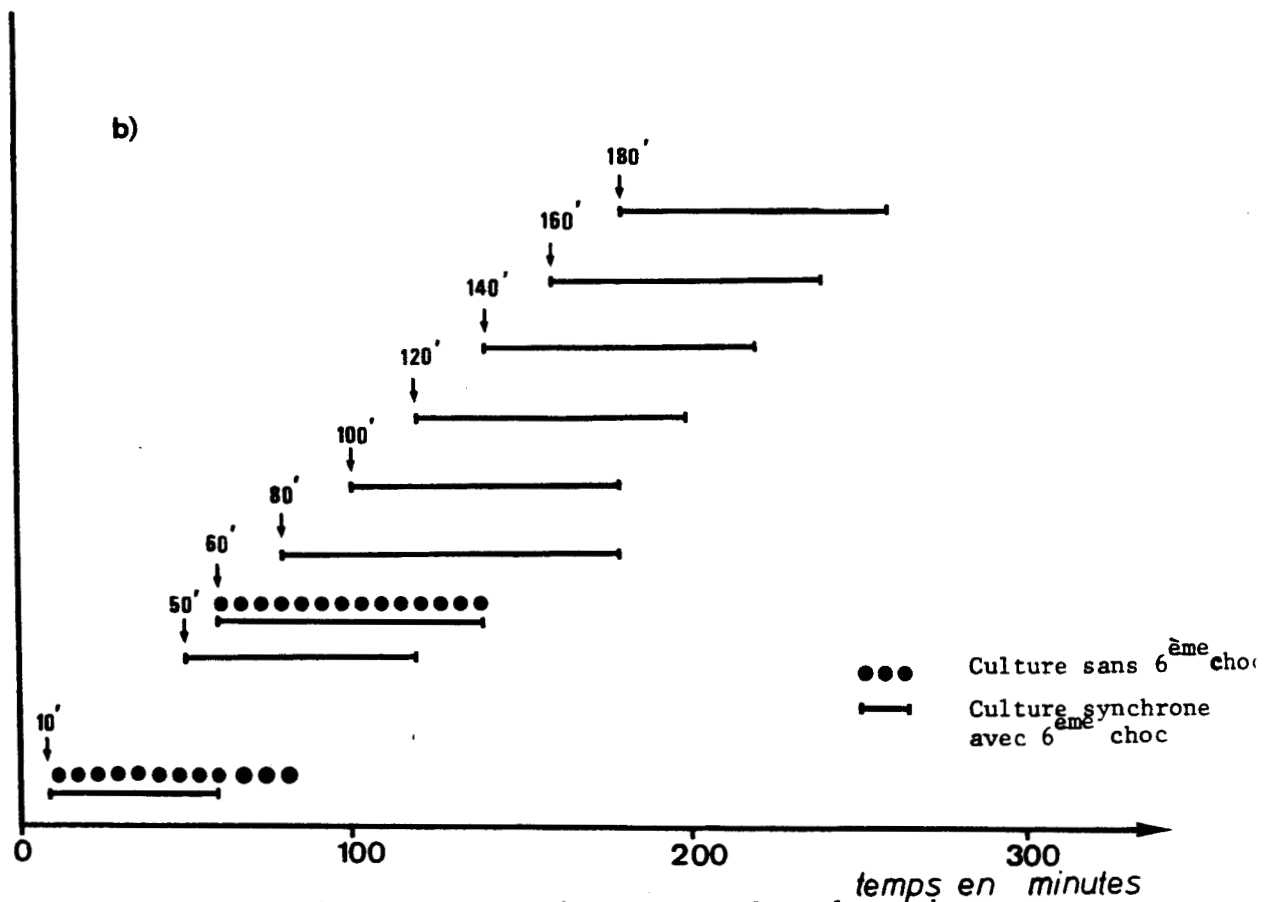
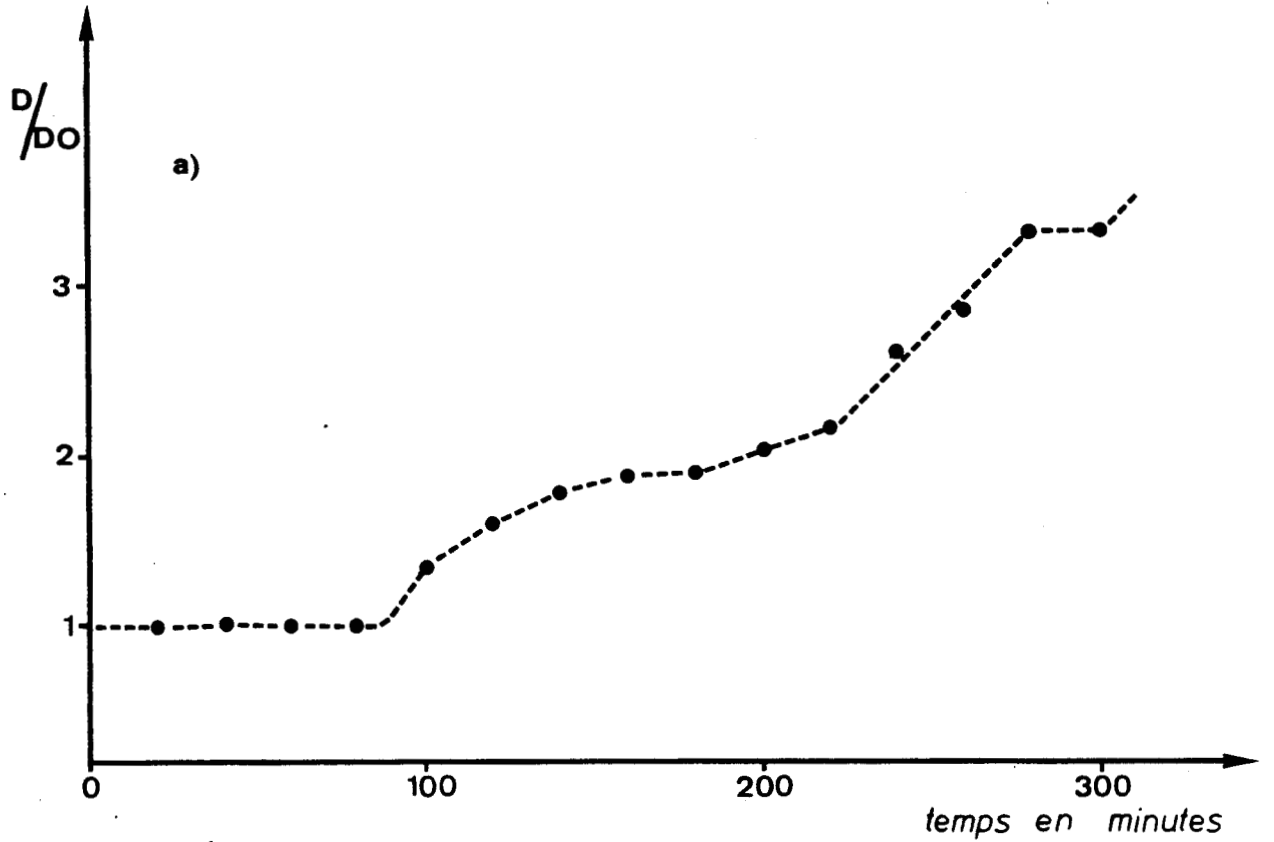


Figure 18 : a) Evolution de la population au cours du cycle synchrone
b) Diagramme des durées pendant lesquelles les $R_A \geq 1$ en fonction du moment d'addition de l'actinomycine D au cours du cycle pour la MDH

Tableau XI : Valeurs de R_A obtenues pour la malate déshydrogénase en culture synchrone
 en l'absence du sixième choc thermique
 (valeurs obtenues à partir de deux expériences)

R_A / Temps	20'	40'	60'	80'	100'	120'	140'	160'	180'	200'
Actinomycine t_{10}	1,02	1,04	0,93	0,98	0,89	0,82	0,81	0,76		
Actinomycine t_{60}	1,05	1,13	1,01	1,03	1,08	1	1	0,94		0,88

C H A P I T R E I V :

DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus nous amènerons à discuter successivement les points suivants :

- . signification physiologique de l'évolution des enzymes dans les cultures synchrones et dans les cultures exponentielles ;
- . action des inhibiteurs et interprétation de l'évolution de l'activité au cours du cycle synchrone ;
- . comparaison entre l'action du thirame et l'action de l'actinomycine D.

I - L'ÉVOLUTION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DANS LES CULTURES SYNCHRONES ET LES CULTURES EXPONENTIELLES

L'évolution de l'activité totale est de type exponentiel au cours du cycle cellulaire, aussi bien pour l'IDH que pour la MDH. Il faut toutefois noter une période de transition qui dure environ 100-120 mn pour l'IDH et moins pour la MDH. Cette période passée, et selon les critères de MITCHINSON (60), on peut considérer que l'on a affaire à deux enzymes stables codées de façon continue au cours du cycle cellulaire. Le problème posé par la période de transition sera abordé plus en détail lorsque l'on discutera des résultats obtenus en présence d'actinomycine D.

L'existence de cette période montre tout au moins que la production de l'enzyme est modifiée sous l'influence du traitement de synchronisation.

L'évolution de l'activité spécifique appelle également quelques commentaires.

Au cours du cycle synchrone, l'accélération de la synthèse de la malate déshydrogénase coïncide avec l'initiation des deux divisions synchrones. Ceci peut être en rapport avec l'évolution des mitochondries au cours

du cycle. KOLB-BACHOFEN et VOGELL (43) ont montré que l'organisation des nouvelles membranes mitochondriales s'effectue précisément au moment de l'accélération de la synthèse de la MDH, alors que la division mitochondriale survient au moment où l'activité de l'enzyme est constante.

Mais les travaux de PERASSO (68), sur des paramécies isolées, peuvent permettre d'émettre une autre hypothèse. Les mitochondries s'allongent et se divisent tout au long du cycle cellulaire mais on observe un très grand nombre de divisions juste avant la division cellulaire, ce qui indique qu'à l'approche de la cytodivision les mitochondries non encore divisées terminent leur cycle dans un délai très bref. On peut concevoir que la division mitochondriale accélérée n'est que la conséquence la plus visible d'une série de phénomènes, dont la synthèse de membranes, qui seraient contrôlés par des signaux d'origine cytoplasmique, en relation probable avec l'initiation de la morphogénèse et le passage de la cellule au delà du point de transition. Dans ce cas, la division mitochondriale, dans les cultures synchrones, ne s'effectuerait pas entre les deux divisions comme l'avaient supposé KOLB-BACHOFEN et VOGELL (43), mais juste avant la cytodivision. Ceci repose d'une manière aigüe le problème du cycle mitochondrial dans les cultures synchrones, problème encore sujet à discussion actuellement.

L'évolution de l'activité spécifique de la malate déshydrogénase au cours du cycle synchrone n'est pas un artéfact de synchronisation puisqu'on l'observe également dans les cultures en phase exponentielle de croissance. Le fait que l'augmentation de l'activité spécifique apparaisse régulière tout au long de la multiplication est en accord avec les travaux de HOFER et coll. (35), qui ont montré, chez quatre espèces de protistes, une relation entre le volume mitochondrial et l'activité de la malate déshydrogénase.

A l'inverse, l'évolution de l'isocitrate déshydrogénase à NADP apparaît typiquement différente. Dans les cultures en phase exponentielle de croissance, l'activité spécifique de l'enzyme augmente très rapidement puis

varie peu quand la population atteint 100-150 000 cellules/ml. Or, en dessous de 100 000 cellules/ml, les cellules sont dans leur phase de multiplication la plus active, avec un temps de génération de 160 mm ; entre 100 et 150 000 cellules débute la phase de décélération, le temps de génération passe à 200-220 minutes et va augmenter encore.

Cette période coïncide, d'après de nombreux auteurs (79), avec l'activation de la néoglycogénèse chez *Tetrahymena* et à l'apparition des caractéristiques ultrastructurales signalées par MAY et coll. (56). Si l'isocitrate déshydrogénase à NADP intervenait directement dans la néoglycogénèse, on devrait assister à une forte augmentation de son activité à ce moment là, ce qui n'est pas le cas. Nos résultats sont en accord avec ceux de LEVY et WASMUTH (45), qui n'observent pas d'augmentation de l'activité spécifique de cette enzyme quand ils induisent artificiellement la néoglycogénèse dans les cultures.

En revanche, il semble que l'on puisse invoquer une influence du milieu : au cours de la croissance, les glucides présents dans les peptones et l'extrait de levure s'épuisent progressivement et l'acide aminé le plus abondant dans le milieu, l'acide glutamique (20), sera utilisé à la fois comme substrat énergétique et comme composant des protéines.

II - ACTION DES INHIBITEURS ET INTERPRÉTATION DE L'ÉVOLUTION DE L'ACTIVITÉ AU COURS DU CYCLE SYNCHRONE

L'action de l'actinomycine D a donné des résultats très différents pour les deux enzymes étudiées. Pour la malate déshydrogénase, à l'exception d'une période initiale courte, le délai au bout duquel l'effet de l'actinomycine D se fait sentir est identique et l'arrêt de l'évolution est progressif. Comme la cycloheximide bloque totalement l'évolution, l'augmentation d'activité correspond à une synthèse, ce produit étant un inhibiteur de la synthèse des

protéines. Les résultats suggèrent que le codage de la MDH est pratiquement continu et se produit à taux relativement constant. Le temps pour obtenir le point de rupture entre témoin et culture traitée, est identique dans les cultures synchrones et dans les cultures exponentielles. Il correspond probablement au délai mesuré par ERNST et OLEINICK (23) pour observer le début de la désagrégation des polysomes lors de l'épuisement de l'ARN messager dans les cellules de *Tetrahymena* traitées par l'actinomycine D.

Pour l'isocitrate déshydrogénase à NADP, les résultats sont beaucoup plus complexes. Le blocage de la transcription pendant les 60 premières minutes du cycle n'influence pas le moment où se situe la rupture avec le témoin et l'arrêt de l'évolution est brutal. Les variations de l'activité enzymatique dans les cultures traitées par l'actinomycine D entre 0 et 60 minutes et le témoin sont absolument identiques, en d'autres termes, une quantité égale d'enzyme a été produite.

D'autre part, la variation de l'activité enzymatique dans les cultures synchrones témoins est faible entre t_0 et t_{60} . Comme la cycloheximide bloque totalement l'évolution, nous sommes amenés à proposer un schéma qui serait le suivant :

A la fin du traitement de synchronisation, il existe dans les cultures synchrones de *Tetrahymena* une certaine quantité d'ARNm spécifique pour la synthèse de l'isocitrate déshydrogénase à NADP. Cette quantité est suffisante pour assurer la production normale de l'enzyme dans les cultures synchronisées pendant les 120 premières minutes après la fin du traitement thermique. Entre 0 et 60 minutes, il n'y a aucune production d'ARN messager spécifique dans les cellules. A la 80ème minute, une petite quantité d'ARNm a été transcrit car l'arrêt de l'évolution de l'activité n'est plus brutal mais progressif. Au delà de 90 mn, la synthèse d'ARNm s'effectue de façon régulière et analogue à celle se produisant dans des cultures exponentielles.

L'addition d'actinomycine D à $t = 10$ mn, n'entraîne une divergence par rapport au témoin que 120 mn plus tard alors que le délai, au delà de $t = 100$ et dans les cultures exponentielles est plus court (80 mn), ce qui pourrait indiquer que le stock d'ARNm est plus important à la fin du traitement thermique.

D'autres hypothèses explicatives peuvent être avancées : le choc thermique survient 160 minutes après le précédent dans le système de synchronisation étudié. A ce moment, on se trouve, si le choc ne survient pas, à 40 minutes seulement de la division suivante. L'application du choc reporte la division 105 minutes plus tard et allonge donc considérablement la durée de la phase G_2 . Le codage de l'enzyme peut très bien être interrompu pendant cette période complémentaire où surviennent de nombreux phénomènes de réorganisation et de synthèses absolument indispensables à la poursuite du développement de la cellule (28). La synthèse d'ARNm spécifique ne reprendrait que lorsque les cellules auraient dépassé le point de transition.

Enfin, on sait que le choc thermique exerce une influence très nette sur de nombreux ARNm. FINK et ZEUTHEN (28) ont montré que chez *Tetrahymena* soumis à des chocs thermiques, la synthèse de certaines protéines est activée et d'autres sont réprimées. La synthèse accrue de protéines dites de choc thermique, est dépendante d'ARNm spécifiques car elle est bloquée par un traitement à l'actinomycine D avant le choc thermique. La synthèse des protéines dites de choc thermique correspond donc à l'activation de gènes spécifiques.

Il est possible que le gène codant pour l'isocitrate déshydrogénase à NADP soit activé à haute température. L'une des causes de cette activation pourrait être la modification dans la nature des acides gras membranaires consécutive à l'élévation thermique. On sait que la régulation de la fluidité membranaire se fait, à court terme, par l'intermédiaire d'une désaturase (12). L'exposition continue des cellules à des températures élevées doit provoquer des modifications dans la synthèse des lipides, synthèse où l'isocitrate déshydrogénase à NADP jouerait un rôle (79).

Enfin, on ne peut écarter totalement l'hypothèse d'un stock endogène d'enzyme, contrôlé par un activateur thermosensible influencé par le choc thermique.

Pour répondre à toutes ces questions, il faut pouvoir déterminer, à tout moment, dans la culture, les quantités de protéines enzymatiques et d'ARNm spécifiques. Cela suppose la préparation préalable d'anticorps spécifiques et d'une sonde moléculaire de DNA.

III - COMPARAISON ENTRE LES EFFETS DU THIRAME ET CEUX DE L'ACTINOMYCINE D

Le thirame et l'actinomycine D présentent un certain nombre d'effets analogues chez *Tetrahymena* : inhibition quasi totale de la synthèse d'ARN, ségrégation nucléolaire. En revanche, le thirame bloque immédiatement l'évolution de la malate déshydrogénase, ce que ne fait pas l'actinomycine D, mais ce que fait, par contre, la cycloheximide. Nos travaux antérieurs (29) ont montré que le thirame n'agissait spécifiquement sur la réaction de déshydrogénation du malate que pour des doses considérablement plus élevées que celles nécessaires pour bloquer l'évolution de l'activité.

De même, dans un système *in vitro*, le thirame n'a aucune influence sur la transcription.

Vis-à-vis de l'isocitrate déshydrogénase à NADP, le thirame présente une action identique à celle de l'actinomycine D quand il est ajouté à $t = 10$; mais bloque immédiatement l'évolution de l'activité, quand il est ajouté à $t = 90$. L'effet observé à $t = 10$ vient à l'appui de l'hypothèse d'un arrêt de la transcription d'ARNm spécifique pendant une certaine période après le choc thermique.

En effet, l'action différente du thirame observée sur la malate déshydrogénase et l'isocitrate déshydrogénase à NADP semble en relation avec

l'existence pour l'IDH à NADP, d'une période de non codage qui semble se terminer au point de transition. En dehors de cette période l'évolution de l'activité de l'enzyme est bloquée de façon identique à celle de la malate déshydrogénase.

La cause de ce phénomène apparaît encore très obscure et demande, pour être élucidée, des travaux complémentaires. Nos travaux recourent parfaitement ceux de MEREAU (58) qui avait constaté un effet très différent du thirame sur les cultures synchrones de *Tetrahymena* selon que le produit était administré avant ou après le point de transition. GROLIERE et coll. (communication personnelle) ont également observé des résultats très différents sur la morphogénèse.

Par ailleurs, certains travaux ont montré que la récupération du profil normal de synthèse des ARN dans les cultures de *Tetrahymena* synchronisées n'avait lieu qu'après une période assez longue. L'utilisation des cultures synchrones de *Tetrahymena* pour l'étude de la cible cellulaire des produits chimiques doit tenir compte de cet état de fait. Il semble bien que les cultures, avant le point de transition, soient dans une phase de restauration qui n'est pas présente dans les cellules non soumises à un traitement thermique, ce qui peut expliquer l'allongement de la phase G₂.

Le point de départ utilisable pour le travail serait la période d'initiation de la morphogénèse, c'est-à-dire à peu près à la 60ème minute. A partir de ce moment, il serait possible d'étudier les deux divisions successives de la culture.

Des travaux complémentaires sont encore nécessaires pour pouvoir préciser exactement les modalités d'utilisation des cultures synchrones de *Tetrahymena*, permettant de bénéficier des avantages du modèle sans introduire d'artéfacts nuisibles pour l'interprétation des résultats.

CONCLUSION

Nos travaux nous ont permis d'approfondir les connaissances sur *Tetrahymena* synchrone.

Les améliorations apportées au dosage de l'isocitrate déshydrogénase à NADP ainsi que la congélation des échantillons à l'azote liquide, nous a permis une analyse de cette enzyme au cours du cycle cellulaire synchrone ce qui n'avait pas été étudié auparavant.

Au niveau de l'activité totale, si l'IDH à NADP et la MDH présentent toutes les deux une évolution de type exponentiel, aussi bien dans les cultures synchrones que dans les cultures normales, nous avons toutefois pu observer un impact de la synchronisation différent sur les deux enzymes. En effet, l'IDH à NADP est beaucoup plus perturbée par le traitement que la MDH, l'évolution ne redevenant normale qu'une fois le point de transition dépassé.

Quant à l'activité spécifique, elle évolue de façon croissante mais là encore, on retrouve une différence entre les deux enzymes. L'augmentation de l'activité spécifique avec le nombre de cellules semble liée pour la MDH à l'augmentation du volume mitochondrial, tandis que pour l'IDH à NADP, on observe un arrêt de cette augmentation à l'approche de la phase stationnaire. Nous sommes amenés à penser que l'évolution de l'IDH à NADP serait en relation avec son rôle éventuel comme fournisseur d'isocitrate à partir de l' α cétooglutarate. En effet, le milieu étant pauvre en glucides et l'acide aminé le plus abondant étant l'acide glutamique, ce dernier peut être utilisé comme substrat énergétique et comme composant des protéines.

L'étude des inhibiteurs spécifiques : la cycloheximide et l'actinomycine D, nous ont montré l'influence du traitement de synchronisation sur les deux enzymes et nous ont permis de mieux comprendre leur réponse au thirame.

Nous avons pu constater que pendant les 60 premières minutes du cycle, il n'y avait pas de transcription au niveau de l'isocitrate déshydrogénase à NADP d'une part, d'autre part à la fin du dernier choc thermique, on se trouvait en présence d'une capacité de synthèse de cette enzyme plus grande que dans les cultures exponentielles et en fin de cultures synchrones. Le choc thermique pourrait donc activer la synthèse de cette enzyme.

Quant à la malate déshydrogénase, elle montre aussi bien dans les cultures synchrones que dans les cultures exponentielles une synthèse continue.

Cette étude nous permet de mieux saisir l'action différente du thirame au niveau de ces deux enzymes. L'action du produit est différente suivant la façon dont le codage des protéines est affecté par le choc thermique et l'identité de réponse a été obtenue quand les cultures ont dépassé le point de transition (60 minutes).

Nos travaux montrent qu'une bonne connaissance de l'impact de la synchronisation est nécessaire pour l'utilisation du cilié *Tetrahymena pyriformis* synchrone en écotoxicologie. En particulier, il s'avère de plus en plus évident que l'administration de produit toxique avant le point de transition peut amener à des interprétations discutables. Le point de départ utilisable pour les cultures synchrones de *Tetrahymena* serait situé à 60 minutes après la fin du choc thermique et la période d'étude pourrait s'étendre sur les deux divisions synchrones.

B I B L I O G R A P H I E

- (1) AIVASASHVILLI V.A., BEABEALASHVILLI R.Sh. (1983). Sequence-specific inhibition of RNA elongation by actinomycin D. *Febs. Letters*, 160, 1, 2, 124-128
- (2) ANDERSEN H.A. (1977). Replication and functions of macronuclear DNA in synchronously growing populations of *Tetrahymena pyriformis*. *Carlsberg Res. Commun.*, 42, 4, 225-248
- (3) ANDERSEN H.A., ENBERG J. (1975). Timing of the ribosomal gene replication in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.*, 92, 159-163
- (4) ANDERSEN H.A., NIELSEN S.T. (1978). Regulation of RNA synthesis in *Tetrahymena pyriformis*, secretion of regulatory factors. *J. Cell. Sci.* H 11449 CEL
- (5) AUFDERHEIDE K.J., FRANKEL J., WILLIAMS N.E. (1980). Formation and positioning of surface related structures in protozoa. *Microb. Rev.*, 44, 2, 252-302
- (6) BERKALOFF A., BOURGUET J., FAYARD P. et N., LACROIX J.C. (1981). *Biologie et physiologie cellulaire*. Tome IV. Collection méthodes Hermann Paris, 186 p.
- (7) BIRD R.C., ZIMMERMAN A.M. (1981). Tubulin synthesis during the synchronous cell cycle of *Tetrahymena*. *Can. J. Biochem.*, 59, 937-943
- (8) BLUZAT R., JONOT O., SEUGE J. (1981). Toxicité aigüe d'un fongicide, le thirame (dithiocarbamate) chez le mollusque pulmoné d'eau douce *Lymnaea stagnalis*. Colloque Inter. d'Ecotoxicologie, Lille 16-19/11/1981
- (9) BYFIELD J.E., LEE Y.C. (1970). The effect of synchronizing temperature shifts on the synthesis and translation of replication supporting messengers in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.*, 61, 42-50

- (10) BYFIELD J.E., LEE Y.C. (1970). Do synchronizing temperature shifts inhibit RNA synthesis in *Tetrahymena pyriformis* ? J. Protozool., 17, 3, 445-453
- (11) CARATERO C., BES J.C., CARATERO A., PLANEL H. (1983). Etude structurale du nucléole et de la nucléologenèse chez *Tetrahymena pyriformis*. Protistol. XIX, 2, 177-187
- (12) CLARKE A. (1981) in Morris G.J. - Clarke A. Effects of low temperatures on biological membranes, Academic Press, 55-81
- (13) CORLISS J.O. (1952). Characterization of the family *Tetrahymenidae* nov. fam. Proc. Soc. Protozool., 3, 4 (abstr.)
- (14) CORLISS J.O. (1974). The changing world of ciliate systematics : Historical analysis of past efforts and a newly proposed phylogenetic scheme of classification for the protistan *phylum ciliophora*. System Zool., 23, 1, 91-138
- (15) COTRELL S.F., AVERS C.J. (1970). Evidence of mitochondrial synchrony in synchronous cell cultures of yeast. Biochem. Biophys. Res. Comm., 38, 5, 973-980
- (16) COWAN A.E., YOUNG P.G. (1978). The formation of several mitochondrial enzymes during the cell cycle in heat synchronized *Tetrahymena pyriformis* ST. Exp. Cell. Res., 112, 79-87
- (17) CRAIG N., KOSTURA M. (1983). Inhibition of protein synthesis in CHO cells by actinomycin D : lesion occurs after 40 s initiation complex formation. Biochem., 22, 6064-6071
- (18) CURGY J.J. (1973). Action de l'actinomycine D sur l'incorporation *in vivo* de l'uridine ³H par les mitochondries de *Tetrahymena pyriformis*. Etude autoradiographique au microscope électronique. J. de Microscopie, 18, 2, 155-172

- (19) DICKENS M.S., LUCAS-LENARD J., ROTH J.S. (1977). Evidence for preformed mRNA in the induction of TMP synthetase in *Tetrahymena pyriformis*. Exp. Cell. Res., 110, 331-335
- (20) DIVE D. (1981). Nutrition et croissance de *Colpidium campylum*, contribution expérimentale, possibilités d'application en écotoxicologie. Thèse Docteur es Sciences Naturelles, Univ. Sci. Techn., Lille I, 285 p.
- (21) DIVE D., LECLERC H., PERSOONE G. (1980). Pesticide toxicity on the ciliate protozoan *Colpidium campylum* : possible consequences on the effect of pesticides in the aquatic environment. Ecotox. Env. Safety, 4, 129-134
- (22) ECKERT W.A., FRANKE W.W., SCHEER V. (1975). Nucleocytoplasmic translocation of RNA in *Tetrahymena pyriformis* and its inhibition by actinomycin D and cycloheximide. Exp. Cell. Res., 94, 31-46
- (23) ERNST S.G., OLEINICK N.L. (1977). Actinomycin D in *Tetrahymena*. Non specific inhibition of RNA synthesis and primary and secondary effects on protein synthesis. Exp. Cell. Res., 110, 363-370
- (24) FABREGAT I., SATRUSTEGUI J., MACHADO A. (1983). Citrate synthase of *Tetrahymena pyriformis* : evolutionary and regulatory aspects. Archiv. Biochem. Biophys., 220, 2, 354-360
- (25) FABREGAT I., SATRUSTEGUI J., MACHADO A. (1984). Malate dehydrogenase of *Tetrahymena pyriformis* : evolutionary and regulatory aspects. Comp. Biochem. Physiol., 77 B, 2, 319-323
- (26) FAWAZ K.M., ABDEL GHAFFAR A.S., EL GABALY M.M. (1972). Sensitivity of root-module bacteria to different seed protectants. Symp. Biol. Hung., 11, 417-422

- (27) FINK K. (1980). Thymidine phosphorylation in synchronous cultures of *Tetrahymena pyriformis* GL. *Exp. Cell. Res.*, 127, 438-441
- (28) FINK K., ZEUTHEN E. (1980). Heat shock proteins in *Tetrahymena* studied under growth conditions. *Exp. Cell. Res.*, 128, 23-30
- (29) FOURMAUX-PRIEM M.N. (1981). Utilisation de *Tetrahymena pyriformis* synchrone en écotoxicologie. Valeur indicatrice de deux enzymes mitochondriales. Thèse d'Ingénieur CNAM, Lille, 85 p.
- (30) FRANKEL J. (1970). An analysis of the recovery of *Tetrahymena* from effects of cycloheximide. *J. Cell. Physiol.*, 76, 55-64
- (31) FURGASON W.H. (1940). The significant cytostomal pattern of the "glaucoma - *Colpidium* group" and a proposed new genus and species *Tetrahymena gelei*. *Archiv. Protistenk.*, 94, 224-266
- (32) GABORIT J.M. (1979). Les cultures synchrones de *Tetrahymena pyriformis* GL, contribution à leur application en toxicologie. D.E.A. Univ. Sci. Techn. Lille I, 67 p.
- (33) GOVINDARAJU K., VLASSACK K., HEREMANS K.A.H. (1975). Effect of the thiocarbamates cycloate and diallate and the diocarbamates maneb and thiram on biological nitrogen fixation and nitrogen mineralization in soils. *Med. Fac. Landbowwet. Rijksuni. Gent*, 40, iss 2, 1209-1219
- (34) HILL D.L. (1972). The biochemistry and physiology of *Tetrahymena*. Academic Press, New York, London, 230 p.
- (35) HOFER H.W., PETTE D., SCHWAB STEY H., SCHWAB D. (1972). Enzyme activity pattern and mitochondrio-cytoplasmic relations in protozoa. Comparative study of *Tetrahymena pyriformis*, *Allogromia laticollaris* and *Labyrinthula coenocystis*. *J. Protozool.*, 19, 3, 532-537

- (36) HOWARD A., PELC S.R. (1953). Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* (supplement), 6, 261-273
- (37) KAFFENBERGER W., HEMMERICH B., ECKERT W.A. (1979). Synchronizing temperatures and rRNA metabolism in *Tetrahymena pyriformis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 64 B, 167-173
- (38) KASSIS S., ZEUTHEN E. (1979). Adenylate cyclase and cyclic AMP through the cell cycle of *Tetrahymena*. *Exp. Cell. Res.*, 124, 73-78
- (39) KECSKES M., SCHMIDT K. (1976). Quantitative change of microorganisms of the effect of TMTD in a chernozem soil with forest residues. *Agrokem. Talajtan*, 25, 1-2, 145-162
- (40) KEIDING J., ANDERSEN H.A. (1978). Regulation of ribosomal RNA synthesis in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell. Sci.*, 31, 13-23
- (41) KIDDER G.W., DEWEY V.C. (1951). The biochemistry of ciliates in pure culture. In Lwoff A. *Biochem. Physiol. Protozoa*, 1, Academic Press Inc., New York, 323-400
- (42) KLINCARE A., KRESLINA D., MISKE I. (1971). Composition and activity of the epiphytic microflora of some agricultural plants. *Ecol. Leaf surface Microorganisms. Proc. Int. Symp.*, 191-201
- (43) KOLB-BACHOFEN V., VOGELL W. (1975). Mitochondrial proliferation in synchronized cells of *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.*, 94, 95-105
- (44) LEVINE N.O. (Chairman), CORLISS J.O., COX F.E.G., DEROUX G., GRAIN J., HONIGBERG B.M., LEEDALE G.F., LOEBLICH A.R. III, LOM J., LYNN D., MERINFELD E.G., PAGE F.C., POLJANSKY G., SPRAGUE V., VAVRA J., WALLACE F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27, 1, 37-58

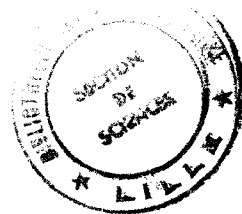
- (45) LEVY M.R., WASMUTH J.J. (1970). Effects of carbohydrate on glycolytic and peroxisomal enzymes in *Tetrahymena*. *Biochim. Biophys. Act.*, 201, 205-214
- (46) LINDHAL P.E.B.I. (1961). Inhibition of growth and photosynthesis in submerged plants with TMTD and Na-dimethyl-dithio-carbamate and reversal of this inhibition of photosynthesis. *Nature*, 191, 51-53
- (47) LINDHAL P.E.B. II. (1962). Inhibition of growth and photosynthesis in submerged plants with TMTD and Na-dimethyl-dithio-carbamate and reversal of this inhibition of photosynthesis. *Physiol. Plantarum*, 15, 607-622
- (48) LINDHAL P.E.B. III (1963). Inhibition of growth and photosynthesis in submerged plants with TMTD and Na-dimethyl-dithio-carbamate and reversal of this inhibition of photosynthesis. *Physiol. Plantarum*, 16 (3), 630-644
- (49) LINDHAL P.E.B. (1964). Effects of aquatic plants on tetramethylthiuram disulfide and sodium dimethyldithiocarbamate. *Lantbrukshögsk. Ann.*, 30, 2, 375-404
- (50) LINDHAL P.E.B. (1966). The growth inhibition in unicellular green algae by some N-disubstituted dithiocarbamate derivatives. *Lantbrukshögsk. Ann.*, 32, 1, 65-86
- (51) LINDHAL P.E.B. (1966). On the reversal of the inhibition of photosynthesis induced by sodium dimethyldithiocarbamate and tetramethylthiuram disulfide. *Physiol. Plantarum*, 19, 87-98
- (52) LINDHAL P.E.B., AKERSTROM S. (1965). On the mechanism of inhibition of photosynthesis by N-disubstituted dithiocarbamates and corresponding thiuram disulfides. *Lantbrukshögsk. Ann.*, 31, 4, 459-503
- (53) LLOYD D., POOLE R.K., EDWARD S.W. (1982). *The cell division cycle*. Academic Press Inc., London, 523 p.

- (54) LWOFF A. (1923). Sur la nutrition des infusoires. C.R. Acad. Sci., 176, 928-930
- (55) MARKWELL M.A.K., HAAS S.M., BIEBER L.L., TOLBERT N.E. (1978). A modification of the LOWRY procedure to simplify protein determination in membrane and lipoproteins samples. *Analyt. Biochem.*, 87, 206-210
- (56) MAY L.T., ANDERSON R., HOGG J.F. (1982). Changes of cellular structure and subcellular enzymatic patterns during the activation of glyconeogenesis in *Tetrahymena pyriformis*. *J. of Ultr. Res.*, 81, 271-289
- (57) MELSON F., WEIGELT H. (1966). The influence of tetramethylthiuram disulfide and carbon disulfide on the enzymes monoamine oxydase and alcohol dehydrogenase. *Toxicol. Carbon. Disulfide Proc. Symp.*, Prague, 100-103
- (58) MEREAU M. (1983). Utilisation de *Tetrahymena pyriformis* synchrone en écotoxicologie : contribution à l'étude des effets du thirame (fongicide dithiocarbamate) sur l'ultrastructure cellulaire. Thèse 3è cycle, Univ. Sci. Techn. Lille I, 85 p.
- (59) MEYER H., PAAPE W., RACHNER M. (1962). The action of several rubber constituents in the daphnia test. *Pharmazie*, 17, 409-410
- (60) MITCHINSON J.M. (1969). Enzyme synthesis in synchronous cultures. *Science*, 165, 657-663
- (61) MULLER M., HOGG J.F., DE DUVE C. (1968). Distribution of tricarboxylic acid cycle enzymes and glyoxylate cycle enzymes between mitochondria and peroxisomes in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biol. Chem.*, 243, 5385-5395
- (62) NACHTWEY D.S., DICKINSON W.J. (1967). Actinomycin D : blockage of cell division of synchronized *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.*, 47, 581-595

- (63) NEHRING D. (1966). Toxicity of new pesticides and sewage (treatment agents) to fish. *Z. Fischerei*, 14, 1-2, 1-8
- (64) NILSSON J.R. (1976). Physiological and structural studies on *Tetrahymena pyriformis* GL. *C.R. Trav. Lab. Carlsb.*, 40, 18-19, 215-355
- (65) NILSSON J.R., ZEUTHEN E. (1980). On nucleolar DNA replication in *Tetrahymena pyriformis* GL-8 : an electron microscope autoradiographic study of heat synchronized and exponentially multiplying cells. *Carlsb. Res. Comm.*, 45, 101-111
- (66) ODA Y., MIYATAKE K., NAKANO Y., KITAOKA S. (1981). Subcellular location and some properties of isocitrate dehydrogenase isozymes in *Englena gracilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 11, 2619-2621
- (67) ODEYEMI O., ALEXANDER M. (1977). Resistance of *Rhizobium* strains to phyton, spergon and thiram. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 4, 784-790
- (68) PERASSO R. (1980). La biogénèse des mitochondries. Relation de la mitochondrie avec son milieu. Thèse de Docteur es Sciences Naturelles, Univ. Paris Sud XI, Centre d'Orsay, 107 p.
- (69) PHILLIPS C.A., LLYOD D. (1978). Continuous flow size selection of *Tetrahymena pyriformis* ST : changes in volume, DNA, RNA, protein during synchronous growth. *J. Gen. Microbiol.*, 105, 95-103
- (70) PLESNER P., RASMUSSEN L., ZEUTHEN E. (1964). Techniques used in the study of synchronous *Tetrahymena*. In Zeuthen E., Synchrony in cell division and growth. *Intersc. Publ.*, New York, 543-563
- (71) POOLE R.K., LLYOD D. (1973). Oscillations of enzyme activities during the cell cycle of a glucose repressed fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972 h⁻. *Biochem. J.*, 136, 195-207

- (72) PORTER R.P. (1943). Arasan (thiosan) as a spinach speed treatment. *Plant. Disease Reprtr.*, 27, 262-263
- (73) ROBBINS R.C., KASTELIC J. (1961). Fate of tetramethyl thiuram disulfide in the digestive tract of the ruminant animal. *J. Agr. Food Chem.*, 9, 256-260
- (74) SATIR B. (1967). Effect of actinomycin D on cultural growth phases and on the pattern of total RNA synthesis in *Tetrahymena*. *Exp. Cell. Res.*, 48, 253-262
- (75) SAUVEGRAIN P. (1981). Les micropolluants organiques dans les eaux superficielles continentales. Les pesticides organochlorés et autres. Etude de synthèse de l'AFEE, Rapport 2, 225 p.
- (76) SCHERBAUM O.H., ZEUTHEN E. (1954). Induction of synchronous cell division in mass cultures of *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.*, 6, 221-227
- (77) SCHERBAUM O.H., ZEUTHEN E. (1955). Temperature induced synchronous division in the ciliated protozoa *Tetrahymena pyriformis* growing in synthetic and proteose peptone media. *Exp. Cell. Res.*, suppl. 3, 312-325
- (78) SHRAGO E., BRECH W., TEMPLETON K. (1967). Glyconeogenesis in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biol. Chem.*, 242, 4060-4066
- (79) SHRAGO E., ELSON C. (1980). In Levandowsky M. - Hutner S.H. *Biochemistry and physiology of protozoa*, vol. 3, Academic Press, 287-312
- (80) SISLER H.D., SIEGEL M.R. (1967). Cycloheximide and other glutaramide antibiotics. In Gottlieb D. - Shaw P.D., *The antibiotics*, springer verlag, New York, 283-307

- (81) SLIMANE M. (1981). Utilisation de *Tetrahymena pyriformis* GL en écotoxicologie. Action du thirame sur la synthèse de l'ADN et de l'ARN. D.E.A. Univ. Sci. Techn. Lille I, 59 p.
- (82) SUD R.K., GUPTA K.G. (1972). Sensitivity of isolates of *Rhizobium* species and *Azotobacter chroococcum* to TMTD and its degradation product Na DDC. Arch. Mikrobiol., 85, 1, 19-22
- (83) SUHR-JESSEN P.B., STEWART J.M., RASMUSSEN L. (1977). Timing and regulation of nuclear and cortical events in the cell cycle of *Tetrahymena pyriformis*. J. of Protozool., 24, 2, 299-303
- (84) TREUHOFF I. (1966). Antimicrobial substances for cosmetic preparations with special consideration of biphenols. Parfucin. Kosmet., 47, 12, 355-358
- (85) WESTERGAARD O., MARCKER K.A., LEER J.C. (1978). Effect of cycloheximide on maturation of replicative intermediates into high molecular weight DNA in *Tetrahymena*. Eur. J. Biochem., 86, 225-260
- (86) YUYAMA S. (1975). Requirement of messenger RNA synthesis for the first division in heat synchronized *Tetrahymena*. Exp. Cell. Res., 90, 381-391
- (87) ZEUTHEN E. (1971). Synchrony in *Tetrahymena* by heat shocks spaced a normal cell generation apart. Exp. Cell. Res., 68, 49-60
- (88) ZEUTHEN E., RASMUSSEN L. (1972). Research in protozoology, vol. 4, T.T. Chen (ed.), Pergamon Press, New York, 9-145



Marie-Noëlle FOURMAUX-PRIEM
TETRAHYMENA PYRIFORMIS SYNCHRONE :
Contribution à l'étude de l'évolution de protéines
enzymatiques à l'aide d'inhibiteurs spécifiques.

THÈSE de Docteur Ingénieur - Lille I - 1984 - N° 359

Cadre de classement :

Mots-clefs : *Tetrahymena pyriformis* - protozoaire cilié -
protéine enzymatique - inhibiteur -
cycloheximide - actinomycine D - thirame -
isocitrate déshydrogénase à NADP -
Malate déshydrogénase.

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

L'évolution de l'activité de deux enzymes, la malate déshydrogénase et l'isocitrate déshydrogénase à NADP a été étudiée chez *Tetrahymena pyriformis* dans des cultures normales et au cours du cycle cellulaire dans des cultures synchronisées par traitement thermique (un choc par génération).

L'évolution de l'activité est de type exponentiel, ce qui suggère un codage continu pour les deux enzymes, codage perturbé dans les cultures synchrones où l'activité de l'isocitrate déshydrogénase à NADP n'évolue normalement qu'à partir de 60-80 mn après la fin du traitement de synchronisation.

L'action de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'évolution de l'activité a été comparée à celle du thirame (fongicide dithiocarbamate). Les résultats obtenus suggèrent que dans les cultures synchrones, aucun codage n'intervient pour l'isocitrate déshydrogénase à NADP pendant les 60 premières minutes du cycle, ce phénomène est directement lié au choc thermique puisque les cultures normales et les cultures n'ayant pas subi de sixième choc donnent une réponse différente. Cette perturbation n'est pas observée pour la malate déshydrogénase. Les effets du thirame ne sont pas équivalents à ceux de l'actinomycine D, bien que des travaux antérieurs de microscopie électronique et d'incorporation d'uridine aient suggéré une forte action au niveau de la synthèse d'ARN.

Les résultats obtenus, outre la connaissance apportée sur l'évolution de l'isocitrate déshydrogénase à NADP, suggèrent que l'utilisation des cultures synchrones pour l'étude de la toxicité des produits chimiques, doit tenir compte des perturbations liées au choc thermique, et que la période d'utilisation commence 60 minutes après la fin du traitement thermique pour s'étendre sur deux divisions successives (jusqu'à la 300^{ème} minute).

JURY

Président : Professeur J. MONTREUIL
Rapporteur : Docteur D. DIVE
Examineurs : Professeur J. KREMBEL
Professeur H. LECLERC
Professeur B. VANDORPE
Docteur F. STROWZYK