

Fractionnement par ultracentrifugation d'une nucléoprotéine de thymus de veau présentant une résistance marquée à la déprotéinisation

L'étude par ultracentrifugation de la dissociation des nucleoprotéines en solution molaire a fait l'objet de nombreux travaux¹ et l'on admet en général qu'il y a scission entre l'acide nucléique et l'histone à cette concentration ionique. Cependant les auteurs ne sont pas d'accord sur le degré de dissociation notamment dans le cas de la nucléohistone de thymus de veau où des valeurs très diverses ont été avancées (de 30%² à 100%³). Un cas de non dissociation de nucléoprotéine isolée de noyaux de foie de rat a même été signalé⁴.

Au cours de nos recherches, nous avons eu l'occasion de préparer une nucléoprotéine de thymus de veau à partir d'un organe prélevé très tôt après la mort de l'animal et cette nucléoprotéine présentait une résistance tout à fait remarquable à la déprotéinisation par saturation avec du chlorure de sodium⁵. Cette nucléoprotéine, extraite de glandes obtenues moins d'une heure après la mort de l'animal, avait été purifiée aussi rapidement que possible pour la débarrasser des enzymes cellulaires puis avait été dissoute en solution molaire et saturée avec du sel. Cette solution résultante était si stable qu'il ne se faisait pas de précipitation d'histone dans le milieu. Par dilution à concentration isotonique en sel, un complexe nucléoprotéique précipitait et cela encore 2 mois après saturation. En opposition, lorsque nous avons traité au chlorure de sodium saturé pour la déprotéiniser une nucléohistone préparée dans les mêmes conditions que précédemment, mais à partir de glandes obtenues 2 h après la mort de l'animal, l'histone en solution saturée commençait à précipiter dès les premiers jours qui suivaient le contact avec le sel et après deux semaines il n'était plus possible d'obtenir de nucléoprotéine par dilution en milieu isotonique.

A la suite de cette observation il nous a paru intéressant d'étudier le comportement à l'ultracentrifugation de cette nucléoprotéine douée d'une si remarquable résistance à l'action du ClNa en solution saturée. Nous avons trouvé après ultracentrifugation que cette nucléoprotéine présente encore, en milieu salin, un certain degré de dissociation et les dosages chimiques, qui ont été effectués sur les diverses fractions séparées (notamment sur un surnageant obtenu après 3 h de centrifugation à 145 000 G), ont montré que la fraction protéique d'une telle nucléoprotéine est hétérogène. Ce surnageant était à peu près totalement dépourvu de phosphore et renfermait une fraction protéique dont la relation N arginine/N protéique (= 8,1%) est de beaucoup inférieure à celle d'une histone (= 25%). Cette fraction protéique nous semble-t-il, peut représenter soit une partie de l'histone pauvre en arginine et riche peut-être en

lysine⁶ soit une simple contamination cytoplasmique. En admettant une répartition homogène dans le liquide centrifugé, nous avons pu calculer que cette fraction protéique pauvre en arginine renfermait 26,3% de l'azote total protéique contenu dans notre solution de nucléoprotéine en expérience.

Par ailleurs nous avons noté que la répétition du processus de dissolution en milieu ClNa 1 M suivi de précipitation en milieu physiologique (0,14 M) qui s'accompagne habituellement d'une légère déprotéinisation a un effet encore moins marqué dans le cas de la nucléoprotéine résistante à l'action des fortes concentrations salines.

T. SAKAKI⁷, A. KNOBLOCH et
R. VENDRELY

Laboratoire de Recherches sur les Macromolécules,
Strasbourg, France, le 26 juin 1956.

Summary

Concerning the degree of resistance to strong saline solution, differences are noted between the nucleoproteins extracted from calf thymus received very soon after the death of the animal (resistant nucleoproteins) and nucleoproteins of calf thymus received later (susceptible nucleoproteins).

⁶ P. F. DAVISON et J. A. V. BUTLER, *Biochim. biophys. Acta* 15, 439 (1955).

⁷ Boursier du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. Adresse actuelle: Faculté des Sciences de l'Université de Nagoya, Chikusa, Nagoya (Japon).

Variations de l'activité des auxines-oxydases dans les racines du *Lens*¹

Introduction. L'activité des auxines-oxydases dans les racines du *Lens culinaris* Med. a été analysée dans des travaux antérieurs² où nous établissons les relations entre ces enzymes et les peroxydases, la genèse des peroxydes et les auxines dont l'étude, sur le même matériel, avait fait l'objet de diverses publications³. Cette présente note a pour but d'examiner l'action de quelques substances (2-4, dichlorophenol: DCP, 2-4, dinitrophenol: DNP, 2-4, dinitro-*o*-cresol: DNC et MnCl₂·4 H₂O: Mn⁺⁺) sur la destruction de l'acide β-indolylacétique (ABIA).

Technique. Les plantules du *Lens* sont cultivées aseptiquement sur papier filtre sans cendre, en boîtes de PETRI (obscurité, 20° ± 0,5). Lorsque leurs racines mesurent 18 mm ± 0,5 (200 sont employées pour chaque essai), les tissus sont broyés (-16°) avec une solution tampon KH₂ - Na₂PO₄, 5,10⁻² M (pH 6,1), puis centrifugés (15 min; 4000 g) et décantés (10 ml). L'analyse du contenu en protéines N, basée sur l'emploi de l'acide trichloroacétique (précipitation), H₂SO₄-H₂O₂ (digestion), se fait par la méthode de NESSLER. Pour évaluer l'activité des auxines-oxydases (exprimée en microgrammes d'ABIA détruit pour 0,1 mg de protéines

¹ Cf. P. F. DAVISON, B. E. CONWAY et J. A. V. BUTLER, *Progr. Biophys.* 4, 148 (1954).

² Q. VAN WINKLE, données non publiées, citées par: J. G. RABATIN, R. FRIEDLAND et W. J. FRAJOLA, *J. biol. Chem.* 203, 23 (1953).

³ P. ex. A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, *J. gen. Physiol.* 30, 117 (1946).

⁴ J. M. LUCK, D. W. KUPKE, A. RHEIN et M. HARD, *J. biol. Chem.* 205, 235 (1953).

⁵ Voir à ce propos l'observation de S. ZAMENHOF, G. GRIBOFF et N. MARULLO, *Biochim. biophys. Acta* 13, 459 (1954). Ces auteurs ont signalé eux aussi que les nucléoprotéines, isolées de thymus prélevés rapidement après la mort de l'animal, montraient une résistance plus marquée à la déprotéinisation.

¹ Ce travail a pu être entrepris grâce à l'appui du *Fonds national suisse pour la Recherche scientifique*.

² P. E. PILET et A. W. GALSTON, *Physiol. Plant.* 8, 888 (1955). - P. E. PILET, *Act. Soc. helv. Sci. nat.* 135, 133 (1955).

³ P. E. PILET, *Mem. Soc. vaud. Sci. nat.* 64, 137 (1951); *Exper.* 7, 362 (1951); *Phyton (Austria)* 4, 247 (1953); *Rev. gén. Bot.* 61, 637 (1954). - P. E. PILET et F. W. WENT, *Amer. J. Bot.* 43, 190 (1956).

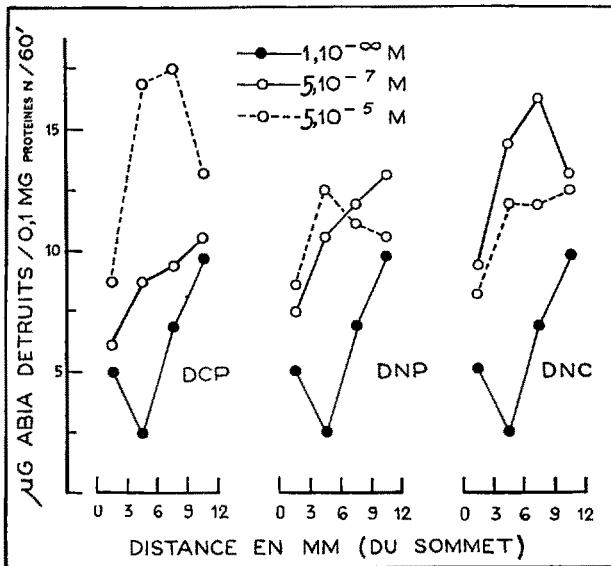


Fig. 1. Activité des auxines-oxydases de fragments de racines (3 mm) en présence de DCP, DNP et DNC. Chaque mesure porte sur l'examen de 200 fragments.

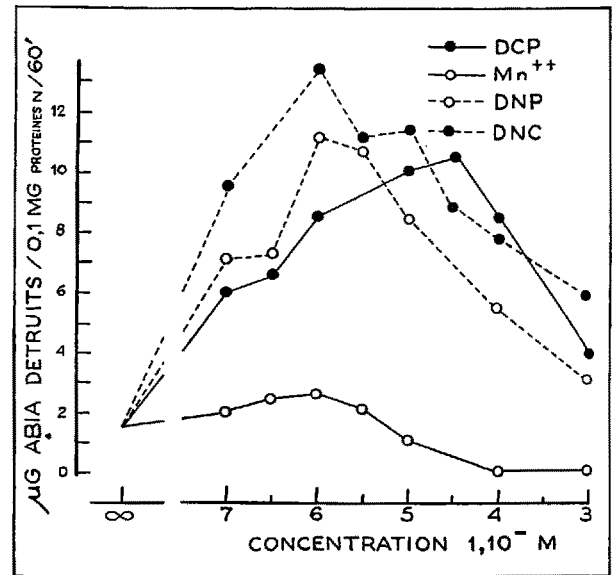


Fig. 2. Activité des auxines-oxydases de fragments de racines (région méristématique: 0,5 à 3,0 mm du sommet), en présence de DCP, DNP, DNC et Mn^{++} . Chaque mesure porte sur l'examen de 200 fragments.

N et pour 60 min), 2 ml d'extrait sont mélangés à 5 ml de solution tampon (pH 6,1). Au temps 0, on ajoute 2 ml d'une solution d'ABIA ($1,10^{-3}$ M); on prend 2 ml du mélange qu'on ajoute à 8 ml du réactif [$FeCl_3$ 1,5 N (3 ml); H_2SO_4 1,84 et 97% (60 ml); H_2O redistillée (100 ml); réactif de SALKOWSKI, TANG et BONNER modifié]. La titration se fait à 22° , $5 \pm 0,2$ et à l'aide du photolorimètre KLETT-SUMMERSON (λ du filtre = $5350 \text{ \AA} \pm 150$).

Quelques travaux. L'action du DCP sur les auxines-oxydases dont nous relevons² le rôle d'activateur, a été aussi étudiée sur des tissus de *Pisum*⁴ et en relation avec le Mn^{++5} , facteur parfois inactif⁶, mais qui peut inhiber⁷ ou stimuler⁸ la destruction de l'ABIA. Il était intéressant de comparer l'action du DCP sur les auxines-oxydases avec des produits voisins. Nous avons choisi le DNP⁹ qui agit sur les processus d'oxydation¹⁰, de phosphorylation¹¹ et sur les deshydrogénases¹² et le DNC qui, plus encore que le DNP, stimule la fixation d' O_2 ¹³.

Résultats

Essai 1 (Fig. 1): Le DCP, le DNP et le DNC assurent une forte augmentation de l'activité des auxines-oxyda-

ses dans les fragments (3 mm) de racines du *Lens*. Cette stimulation est particulièrement nette dans les tissus jeunes. Elle peut être attribuée à l'activation, par ces substances, des processus d'oxydation.

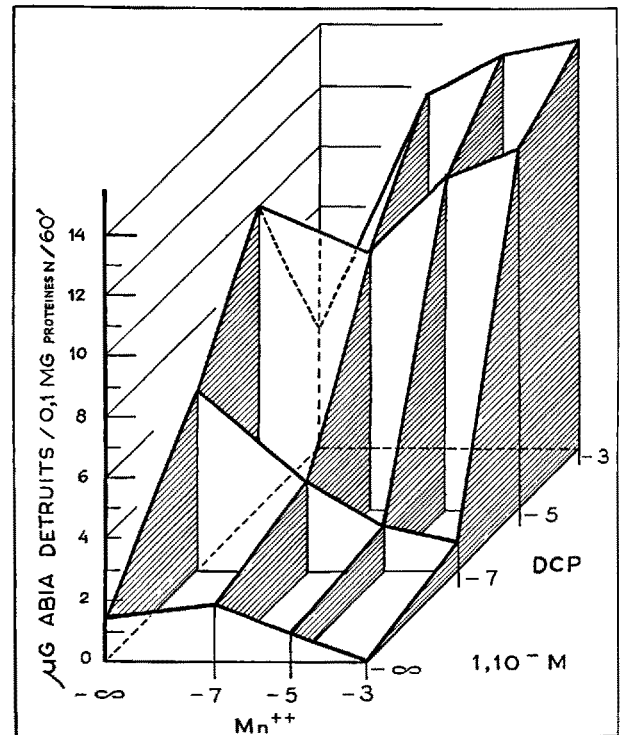


Fig. 3. Activité des auxines-oxydases de fragments de racines (région méristématique: 0,5 à 3,0 mm du sommet), en présence de Mn^{++} et de DCP appliqués en même temps à diverses concentrations. Chaque mesure porte sur l'examen de 250 fragments.

Essai 2 (Fig. 2): L'action comparée, pour des tissus prélevés dans la région méristématique (0,5 à 3,0 mm

⁴ P. L. GOLDACRE, A. W. GALSTON et R. L. WEINTRAUB, Arch. Biochem. Biophys. 43, 358 (1953).

⁵ W. S. HILLMANN et A. W. GALSTON, Physiol. Plant. 9, 230 (1956).

⁶ A. C. WAGENKNECHT et R. H. BURRIS, Arch. Biochem. Biophys. 25, 30 (1950).

⁷ A. W. GALSTON, J. BONNER et R. S. BAKER, Arch. Biochem. Biophys. 42, 456 (1953).

⁸ W. A. GORTNER et M. KENT, J. biol. Chem. 204, 593 (1953).

⁹ C. E. CLIFTON, Advances Enzym. 6, 269 (1946). - F. LIPMANN et N. O. KAPLAN, Ann. Rev. Biochem. 18, 267 (1949).

¹⁰ M. E. KRAHL et G. H. A. CLOWES, J. biol. Chem. 111, 355 (1935); J. Cell. Comp. Physiol. 11, 1 (1938). - J. BONNER, Amer. J. Bot. 36, 429 (1949). - E. H. NEWCOMB, Amer. J. Bot. 37, 264 (1950).

¹¹ R. D. HORCHISS, Advances Enzym. 4, 155 (1944). - J. Mc ELROY, J. Cell. Comp. Physiol. 23, 171 (1944).

¹² L. MASSART et R. DUFAYT, Enzymologia 9, 320 (1941).

¹³ C. H. A. CLOWES et M. E. KRAHL, J. gen. Physiol. 20, 145 (1936). - S. KELLY et G. S. AVERY, Amer. J. Bot. 36, 421 (1949).

comptés à partir de la pointe de la racine; les vieux tissus formant la coiffe étant éliminés) du DCP, du DNP, du DNC et du Mn^{++} est étudiée en fonction de leurs concentrations. Le pH, dont l'importance a été démontrée¹⁴ est rigoureusement maintenu à 6,1, valeur qui correspond au maximum d'activité des auxines-oxydases¹⁵. On peut observer que le Mn^{++} , à fortes concentrations, inhibe, alors que le DCP, le DNP et le DNC activent toujours, mais plus ou moins fortement, les auxines-oxydases.

Essai 3 (Fig. 3): L'action combinée du DCP et du Mn^{++} , pour des tissus méristématiques (0,5 à 3,0 mm du sommet) est examinée. On peut remarquer que si le Mn^{++} est un inhibiteur des auxines-oxydases lorsqu'il est appliqué seul ou avec de faibles concentrations de DCP, son action devient nettement stimulatrice en présence de fortes doses de DCP. Ces résultats confirment donc, sur un autre matériel, les observations antérieures et suggèrent que le Mn^{++} doit agir essentiellement, en ce qui concerne l'inactivation de l'ABIA, en relation directe avec les composés phénoliques des tissus.

L'emploi de ces diverses substances fournit des perspectives nouvelles quant au problème du vieillissement des tissus qui paraît être placé sous le contrôle des auxines endogènes¹⁶ et par conséquent des systèmes auxines-oxydasiques.

P. E. PILET

Institut de Botanique, Université de Lausanne, le 14 septembre 1956.

Summary

2,4-dichlorophenol (DCP), 2,4-dinitrophenol (DNP) and 2,4-dinitro-*o*-cresol (DNC) applied at a concentration of $1 \cdot 10^{-7}$ to $1 \cdot 10^{-3}$ M, produce a dramatic increase in IAA-oxidase activity in young cells of *Lens* root. IAA destruction by 'breis' from root tissues was inhibited by Mn^{++} ion at low concentrations of DCP ($1 \cdot 10^{-8}$ to $1 \cdot 10^{-7}$ M), but was enhanced by Mn^{++} ion at higher ($1 \cdot 10^{-5}$ to $1 \cdot 10^{-3}$ M) DCP levels.

¹⁴ G. STENLID, *Physiol. Plant.* 2, 61 (1949).

¹⁵ Y. W. TANG et J. BONNER, *Arch. Biochem. Biophys.* 13, 11 (1947).

¹⁶ P. E. PILET, VIII Congr. int. Bot. (Paris) 11, 178 (1954); *Act. Soc. helv. Sci. nat.* 135, 133 (1955); *Bull. Soc. bot. suisse* 66, 26 (1956).

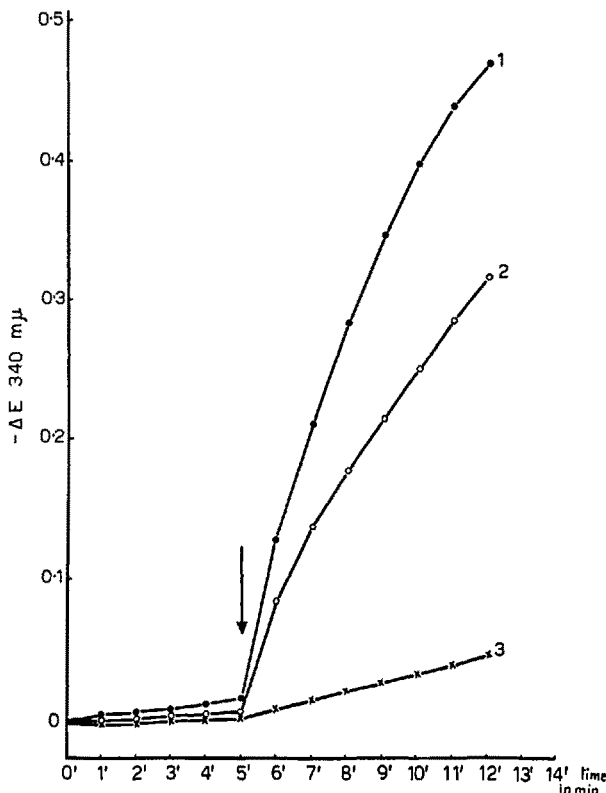
Enzymatic Activities in the Perilymph Phosphohexoseisomerase and Lacticdehydrogenase

In some previous papers on the chemical composition of horse perilymph, we reported data on the amino acid, keto acid and protein content of this biological fluid¹.

The object of the present investigation was to study whether enzymatic activities could be detected in the perilymph. For this purpose we have analyzed phosphohexoseisomerase (PHI) and lacticdehydrogenase (LD) activities of horse perilymph compared with the blood serum and cerebro-spinal fluid activities².

Methods. The perilymph, serum and liquor were collected as previously described from horses immediately (15-30 min) after death. In order to obtain the neces-

sary amount of perilymph, samples of this fluid from 25/30 animals were mixed together. The same operation was performed, to obtain comparable results, for serum and liquor. Enzymatic activities were determined in duplicate on fluids thus collected from three groups of animals. The liquids, stored when necessary at 0°C for a maximum of 24 h, were centrifuged before use at 3000 r.p.m. for 20 min.



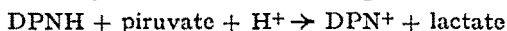
Lacticdehydrogenase activity of serum (1), perilymph (2), and liquor (3). Same conditions as in the test; in this experiment the reaction was started by adding (at arrow) the piruvate.

PHI activity was tested according to the reaction: glucose-6-phosphate (G6P) \longrightarrow fructose-6-phosphate (F6P), determining the amount of F6P formed in 1 h at 37°C in an incubation mixture made up as follows: 0.3 ml 0.045 M G6P (4.5 mg K salt, obtained according to SEEGMILLER from Ba salt 'Sigma')³; 0.3 ml sodium diethylbarbiturate buffer 0.1 M, pH 7.8; 0.2 ml of the fluid under examination.

The reaction was stopped by adding 3 ml of 10% trichloroacetic acid. After centrifugation, 2 ml of the supernatant were used for the F6P determination, by ROE's method⁴.

A standard of fructose was made each time under the same experimental conditions, and corrections for F6P values were made according to UMBREIT *et al.*⁵

LD activity was followed according to the reaction:



determining the amount of DPNH oxidized from the decrease in optical density at 340 mμ.

³ J. E. SEEGMILLER and B. L. HORECKER, *J. biol. Chem.* 192, 175 (1951).

⁴ J. H. ROE, *J. biol. Chem.* 107, 15 (1934).

¹ E. ANTONINI, V. CASORATI, and S. CRIFÒ, *Exper.* 11, 496 (1955); *Revue de Laring.* 1-2, 59 (1956); *La Ric. Scient.* 25, 3035 (1955); *Ann. Otol. Rhinol. and Laryng.* (in press).

² O. BODANSKY, *J. biol. Chem.* 202, 840 (1953). - F. H. BRUNS, W. JACOB, and F. WEVERINK, *Clin. chim. Acta* 1, 63 (1956).

⁵ W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS, and J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism* (Burgess Publ., Minneapolis 1949).