

**EUR 3607 f**

ASSOCIATION

Communauté Européenne de l'Énergie Atomique - EURATOM  
Université Libre de Bruxelles - U.L.B.

APPLICATIONS RADIOBIOLOGIQUES  
DE LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Rapport final

1961-1966

**LIBRARY**

1967



Rapport établi à l'U.L.B.  
Université Libre de Bruxelles, Belgique

Association N° 007-61-10 BIAB

## AVERTISSEMENT

Le présent document a été élaboré sous les auspices de la Commission des Communautés Européennes.

Il est précisé que la Commission des Communautés Européennes, ses contractants, ou toute personne agissant en leur nom :

ne garantissent pas l'exactitude ou le caractère complet des informations contenues dans ce document, ni que l'utilisation d'une information, d'un équipement, d'une méthode ou d'un procédé quelconque décrits dans le présent document ne porte pas atteinte à des droits privatifs;

n'assument aucune responsabilité pour les dommages qui pourraient résulter de l'utilisation d'informations, d'équipements, de méthodes ou procédés décrits dans le présent document.

Ce rapport est vendu dans les bureaux de vente indiqués en 4<sup>e</sup> page de couverture

|                     |          |          |           |           |
|---------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| au prix de FF 16,50 | FB 165,— | DM 13,20 | Lit. 2060 | Fl. 11,95 |
|---------------------|----------|----------|-----------|-----------|

**Prière de mentionner, lors de toute commande, le numéro EUR et le titre qui figurent sur la couverture de chaque rapport.**

Imprimé par Guyot, s.a.  
Bruxelles, décembre 1967

# EUR 3607 f

ASSOCIATION

Communauté Européenne de l'Énergie Atomique - EURATOM  
Université Libre de Bruxelles - U.L.B.

## APPLICATIONS RADIOBIOLOGIQUES DE LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Rapport final

1961-1966

**EUR 3607 f**

RADIOBIOLOGICAL APPLICATIONS OF CELLULAR PHYSIOLOGY -  
Final Report 1961-1966

*Association* : European Atomic Energy Community - EURATOM  
Université Libre de Bruxelles - ULB  
Report prepared at the ULB - Université Libre de Bruxelles (Belgium)  
Association No. 007-61-10 BIAB  
Brussels, December 1967 - 138 Pages - FB 165

A coordinated effort has been carried out to analyze the mechanisms controlling protein synthesis in biological systems of growing complexity : bacteriophages, bacteria, unicellular algae (*acetabularia*), the egg in the various stages of its development differentiated or cancerous cells, the adult mammal. Genetic, biochemical, biophysical and cytochemical methods have been combined to achieve this end. The results obtained should form a useful basis for the study of the effects of radiation at molecular level.

**EUR 3607 f**

RADIOBIOLOGICAL APPLICATIONS OF CELLULAR PHYSIOLOGY -  
Final Report 1961-1966

*Association* : European Atomic Energy Community - EURATOM  
Université Libre de Bruxelles - ULB  
Report prepared at the ULB - Université Libre de Bruxelles (Belgium)  
Association No. 007-61-10 BIAB  
Brussels, December 1967 - 138 Pages - FB 165

A coordinated effort has been carried out to analyze the mechanisms controlling protein synthesis in biological systems of growing complexity : bacteriophages, bacteria, unicellular algae (*acetabularia*), the egg in the various stages of its development differentiated or cancerous cells, the adult mammal. Genetic, biochemical, biophysical and cytochemical methods have been combined to achieve this end. The results obtained should form a useful basis for the study of the effects of radiation at molecular level.

## RÉSUMÉ

Un effort coordonné a été effectué pour analyser les mécanismes qui contrôlent la synthèse des protéines dans des systèmes biologiques de complexité croissante : les bactériophages, les bactéries, l'algue unicellulaire *Acetabularia*, l'œuf aux divers stades de son développement, les cellules différenciées ou cancéreuses, le mammifère adulte. Les méthodes génétiques, biochimiques, biophysiques, cytochimiques ont été combinées dans ce but. Les résultats acquis devraient constituer une base utile pour l'étude, à l'échelle moléculaire, des effets des radiations.

## MOTS-CLÉS

BACTERIOPHAGES  
GENETICS  
NUCLEIC ACIDS  
MOLECULES  
CONFIGURATION  
IMMUNITY  
RIBONUCLEIC ACID

DNA, Genes, Ribosomes.

## TABLE DES MATIERES

|   |    |
|---|----|
| PREFACE . . . . .   | 7  |
| INTRODUCTION GENERALE . . . . .   | 9  |
| RAPPORT SUR L'ACTIVITE DES LABORATOIRES (années 1961-1966)  |    |
| <b>LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE, par R. JEENER .</b>  |    |
| RAPPORT GENERAL . . . . .   | 15 |
| 1 — TRAVAUX D'IMMUNOGENETIQUE . . . . .   | 20 |
| 2 — CARACTERISTIQUES DE LA REACTION ENTRE LE TMV ET LES<br>FRAGMENTS MONOVALENTS ANTI-TMV . . . . .   | 21 |
| 3 — RECHERCHES SUR LA SYNTHESE D'ANTICORPS ANTI-TMV NON<br>PRECIPITABLES PAR L'ANTIGENE INJECTE . . . . .   | 23 |
| 4 — EXISTENCE PROBABLE D'UN ISOMERISME DE CONFIGURATION<br>DES ANTI-CORPS . . . . .   | 24 |
| 5 — RECHERCHES SUR DES MODIFICATIONS DES DETERMINANTS<br>ANTIGENIQUES DU TMV ENTRAINEES PAR L'INCORPORATION<br>DE THIOURACILE DANS L'ACIDE RUBONUCLEIQUE DU VIRUS . | 24 |
| 6 — PUBLICATIONS . . . . .  | 25 |
| 7 — TITRES ACADEMIQUES ET SCIENTIFIQUES — DEPLACEMENTS . .  | 26 |
| <b>LABORATOIRE DE MORPHOGENESE EXPERIMENTALE ET DE<br/>LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE, par J. BRACHET. . . . .</b>   |    |
| 1 — INTRODUCTION . . . . .  | 28 |
| 2 — OOGENESE — MATURATION DE L'OOCYTE . . . . .   | 30 |
| 2.1 DNA . . . . .   | 30 |
| 2.2 RNA . . . . .   | 33 |
| 2.3 Protéines. . . . .  | 35 |

|  |    |
|--|----|
| 3 — FECONDATION ET PARTHENOGENESE . . . . .  | 36 |
| 3.1 DNA . . . . .  | 36 |
| 3.2 RNA et synthèse des protéines . . . . .  | 36 |
| 3.3 Production d'énergie et synthèse des protéines lors de la fécondation de l'œuf d'oursin . . . . .                  | 37 |
| 3.4 Formation de cytasters . . . . .   | 38 |
| 3.5 Ultrastructure des œufs vierges et fécondés de Xénope . . . . .  | 39 |
| 4 — DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE . . . . .   | 39 |
| 4.1 Considérations théoriques . . . . .  | 39 |
| 4.2 DNA . . . . .  | 40 |
| 4.3 RNA . . . . .  | 44 |
| 4.4 Protéines. . . . .   | 47 |
| 4.5 Production d'énergie au cours du développement des Batraciens . . . . .  | 51 |
| 5 — ACETABULARIA . . . . .   | 52 |
| 5.1 Considérations théoriques . . . . .  | 52 |
| 5.2 DNA . . . . .  | 53 |
| 5.3 RNA . . . . .  | 56 |
| 5.4 Protéines. . . . .   | 62 |
| 5.5 Rythme photosynthétique . . . . .  | 64 |
| 6 — CELLULES DIFFERENCIEES — DIVERS . . . . .  | 65 |
| 6.1 Mode de synthèse des histones . . . . .  | 65 |
| 6.2 Chromosomes géants des larves de Diptères . . . . .  | 66 |
| 6.3 Fixation d'actinomycine et cinétique de la réaction de Feulgen dans les noyaux de cellules différenciées . . . . . | 69 |
| 6.4 DNA kinétoplastique chez les Trypanosomidés . . . . .  | 69 |
| 6.5 Mode d'action du mercaptoéthanol . . . . .   | 70 |
| 6.6 Etude de la synthèse et de la spécificité des protéines ribosomales . . . . .                                      | 70 |
| 6.7 Divers . . . . .   | 71 |
| 7 — PUBLICATIONS . . . . .   | 71 |
| 8 — TITRES ACADEMIQUES ET SCIENTIFIQUES — DEPLACEMENTS . . . . .   | 81 |
| <br><b>LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE, par H. CHANTRENNE</b>   | 82 |
| 1 — ISOLEMENT ET ETUDE DU RNA MESSAGER DES RETICULOCYTES DE LAPIN . . . . .  | 82 |
| 1.1 Introduction. . . . .  | 82 |
| 1.2 Incorporation de précurseurs marqués dans les RNA de réticulocytes . . . . .                                       | 83 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.3 | Détection du RNA messager . . . . .  | 83 |
| 1.4 | Isolement du RNA messager . . . . .  | 84 |
| 1.5 | Nouvelle méthode d'isolement du RNA messager . . . . .   | 84 |
| 1.6 | Propriétés du RNA messager . . . . .   | 85 |
| 1.7 | Examen du RNA 9 S au microscope électronique . . . . .   | 85 |
| 2   | — RECHERCHES SUR LES ENZYMES D'ACTIVATION ET LEURS INTER-<br>ACTIONS AVEC LES RNA DE TRANSFERT . . . . . | 85 |
| 2.1 | Introduction. . . . .  | 85 |
| 2.2 | Dénaturation contrôlée d'enzymes d'activation . . . . .  | 86 |
| 2.3 | Modification des RNA de transfert par l'hydroxylamine . . . . .  | 86 |
| 2.4 | Modification physique des RNA de transfert par la proflavine . . . . .                                   | 87 |
| 3   | — RECHERCHES SUR LA DIFFERENCIATION DE LA MACHINE A FAIRE<br>LES PROTEINES . . . . .                     | 88 |
| 3.1 | Introduction. . . . .  | 88 |
| 3.2 | Protéines ribosomiales du foie et des réticulocytes de lapin . . . . .                                   | 88 |
| 3.3 | Enzymes d'activation de foie et de réticulocytes . . . . .   | 89 |
| 3.4 | Remarque . . . . .   | 90 |
| 4   | — FORMATION DES ENZYMES HEMATINIQUES CHEZ LA LEVURE . . . . .  | 90 |
| 4.1 | Introduction. . . . .  | 90 |
| 4.2 | Cytochrome peroxydase . . . . .  | 90 |
| 4.3 | Isocytochromes c . . . . .   | 91 |
| 5   | — ACTION DE LA 8-AZAGUANINE SUR LA SYNTHÈSE DES RNA ET DES<br>PROTEINES. . . . .                         | 91 |
| 5.1 | Introduction. . . . .  | 91 |
| 5.2 | Absence d'effets de l'azaguanine dans un tissu qui ne fait pas de RNA . . . . .                          | 92 |
| 5.3 | Nature des RNA dans lesquels l'azaguanine s'incorpore . . . . .  | 92 |
| 5.4 | Inhibition sélective de la synthèse de certaines protéines . . . . .                                     | 93 |
| 5.5 | Lésions secondaires causées par la 8-azaguanine . . . . .  | 94 |
| 6   | — TRAVAUX EBAUCHES ET RECHERCHES OCCASIONNELLES . . . . .  | 94 |
| 7   | — PUBLICATIONS . . . . .   | 95 |
| 8   | — TITRES ACADEMIQUES ET SCIENTIFIQUES — DEPLACEMENTS . . . . .   | 98 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>LABORATOIRE DE BIOPHYSIQUE ET RADIOBIOLOGIE, par<br/>M. ERRERA . . . . .</b>   | <b>101</b> |
| 1 — PREMIERES ETAPES DE LA SYNTHÈSE DU RNA DANS LES<br>CELLULES DE HELA . . . . .   | 101        |
| 1.1 Synthèse du RNA au cours du cycle mitotique . . . . .   | 103        |
| 1.2 Aspects radiobiologiques du métabolisme du RNA . . . . .  | 103        |
| 2 — DIFFERENCIATION DES HEMATOBLASTES DES AIRES VASCULAIRES<br>DES EMBRYONS DE POULET . . . . .   | 104        |
| 3 — ETUDE DU DNA DE MICROORGANISMES (BACTERIES ET VIRUS)  | 105        |
| 3.1 Etude autoradiographique de DNA de <i>E. coli</i> et de phage par la méthode<br>de Cairns. . . . .                                  | 105        |
| 3.2 Etude du DNA de virus par microscopie électronique . . . . .  | 106        |
| 3.3 Radiobiologie du DNA des microorganismes . . . . .  | 106        |
| 4 — BIBLIOGRAPHIE . . . . .   | 107        |
| 5 — TITRES ACADEMIQUES ET SCIENTIFIQUES — DEPLACEMENTS .  | 109        |
| <br><b>LABORATOIRE DE GENETIQUE, par R. THOMAS . . . . .</b>  | <b>111</b> |
| 1 — DEVELOPPEMENT DU LABORATOIRE DE GENETIQUE PENDANT<br>LA DUREE DU CONTRAT . . . . .  | 111        |
| 2 — ENONCE DES RESULTATS LES PLUS SAILLANTS . . . . .   | 112        |
| 2.1 Contrôle du développement des bactériophages tempérés . . . . .   | 112        |
| 2.2 Spécificité de la traduction . . . . .  | 112        |
| 3 — RAPPORT SCIENTIFIQUE . . . . .  | 112        |
| 3.1 Le contrôle de la réplication et de l'expression génétiques chez les bactério-<br>phages tempérés . . . . .                         | 112        |
| 3.2 Le rôle des ribosomes dans la spécificité de la traduction des chaînes poly-<br>nucléotidiques en chaînes polypeptidiques . . . . . | 123        |
| 4 — PUBLICATIONS . . . . .  | 125        |
| 5 — TITRES ACADEMIQUES ET SCIENTIFIQUES — DEPLACEMENTS .  | 128        |
| <br>SEMINAIRES  | 131        |

## APPLICATIONS RADIOBIOLOGIQUES DE LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE (\*)

### PREFACE

Le contrat d'Association N° 007-71-10 BIAB entre Euratom et l'U.L.B. a été signé pour une période de cinq ans à partir d'octobre 1961.

Le but de l'Association était double : exécution de travaux de recherche dans certains domaines étroitement liés de la biologie moléculaire et de la radiobiologie, domaines d'une importance décisive pour la connaissance profonde des dangers radiologiques et des problèmes connexes; accroissement et amélioration des disponibilités de la Communauté en spécialistes et experts en la matière.

A cet effet, il était entendu que l'Université regrouperait les ressources de cinq de ses départements de biologie en un seul institut de recherche en leur fournissant des locaux adéquats et que les partenaires contractuels les rééquiperait entièrement de manière à permettre la continuation de ces recherches au niveau du standing mondial le plus élevé. En même temps, une communauté d'action des chercheurs avec des groupes similaires dans d'autres régions de la Communauté devait se développer notamment par l'intermédiaire des membres du Comité de gestion.

Dans l'ensemble, ces objectifs ont été atteints. Les divers départements ont été dotés d'un comité unique de direction. Le Comité de gestion (\*\*) comprenait des membres de la direction d'autres grands instituts ou des membres de comités analogues dans d'autres instituts. Les membres du personnel ont participé activement à des groupes d'étude ou de liaison à l'échelle communautaire, tant dans le domaine fondamental qu'appliqué. Les nouveaux laboratoires de Rhode-Saint-Genèse sont parmi les plus modernes tant au point de vue de leur conception que de leur réalisation et de leur adaptation au type de recherches qui y sont poursuivies. Ils représentent une surface de plancher de 11 000 m<sup>2</sup>. L'ensemble de l'appareillage s'élève à une valeur d'environ 40 000 000 FB.

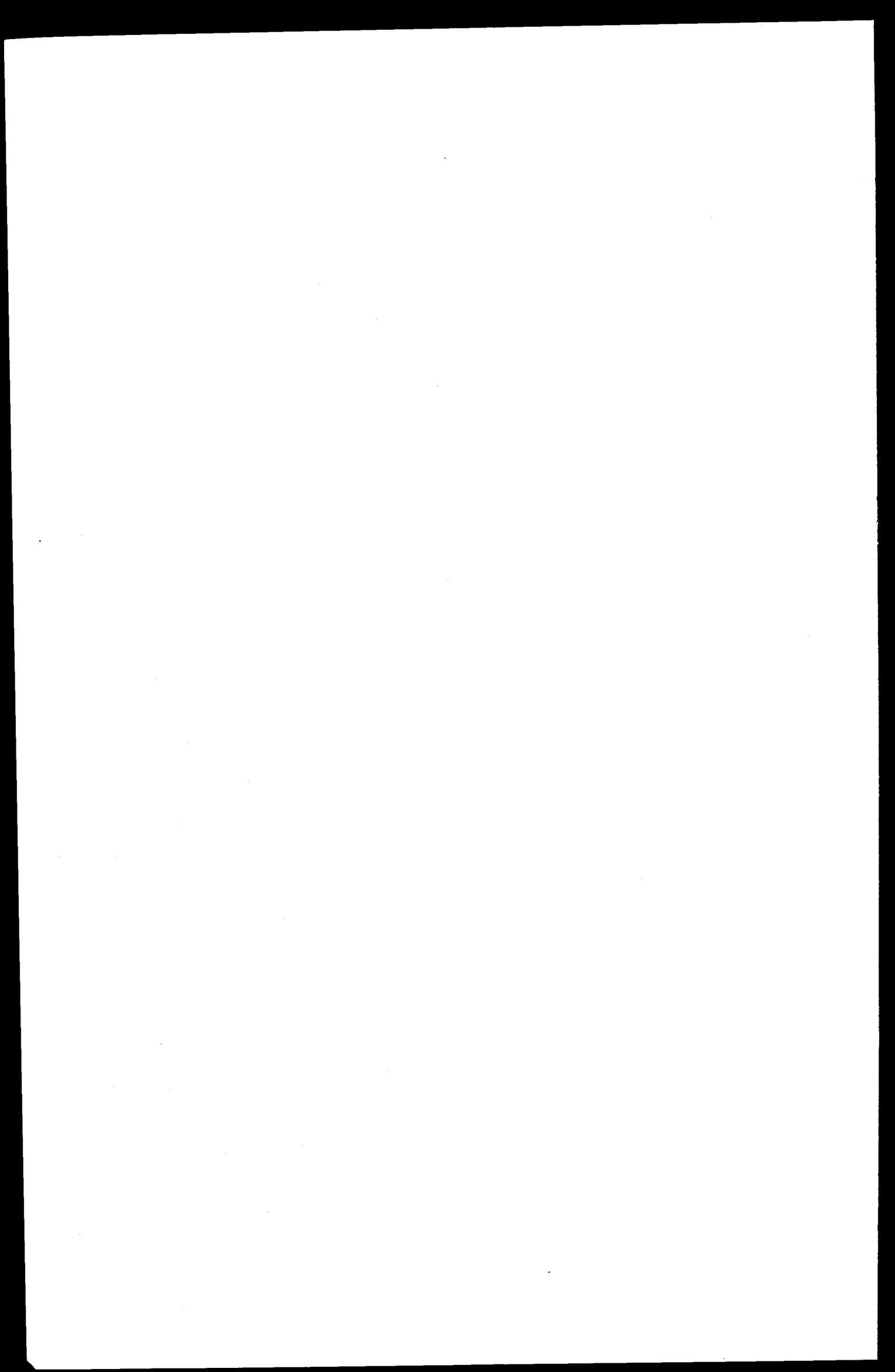
Le groupe a créé une licence en biologie moléculaire et a participé au cycle de cours organisé par Euratom sur la radiobiologie et la biologie moléculaire. Par ailleurs, il a reçu des boursiers dans le cadre de l'accord avec Euratom afférent à la formation interdisciplinaire dans ce domaine.

En dépit des agrandissements et des déménagements, le résultat des recherches a été remarquable du double point de vue quantitatif et qualitatif, comme en témoigne le rapport technique ci-joint et les quelque 300 publications qui ont paru dans la littérature scientifique; il a considérablement amélioré la compréhension de certains problèmes relevant de la compétence d'Euratom. Mais, ce qui est peut-être plus important encore, le contrat en question a donné forme à un Institut de recherche d'ampleur européenne et de standing mondial qui représente pour la Communauté un avantage qu'elle se doit de mettre pleinement à profit au cours de l'étape ultérieure.

---

(\*) Manuscrit reçu le 16 juin 1967.

(\*\*) Pour l'U.L.B. : MM. De Keyser, De Saeyer, Gillet.  
Pour Euratom : MM. Appleyard, Buzzati, Bertinchamps, Carpentier.



## INTRODUCTION GENERALE

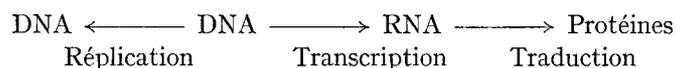
Ce sont, naturellement, les effets produits par les radiations ionisantes au niveau de l'*organisme* entier (de l'homme, en particulier) qui sont les plus importants pour les radiobiologistes qui se préoccupent de la radioprotection ou de la guérison des radiolésions. Toutefois, la complexité d'un organisme aussi perfectionné que l'est un mammifère rend fatalement très délicate l'analyse précise et l'interprétation des résultats obtenus après irradiation : de nombreux mécanismes de contrôle (nerveux et endocriniens, en particulier), qui ne sont qu'imparfaitement connus, viennent s'ajouter à la complexité anatomophysiologique des organismes supérieurs. La radiosensibilité inégale des divers organes ou tissus n'est pas faite pour simplifier l'analyse des résultats.

Une telle analyse devient plus aisée au niveau *cellulaire*, qu'il s'agisse de cellules cultivées *in vitro*, d'embryons en voie de développement ou même de cellules hautement différenciées : c'est à leur niveau (et à celui des organismes unicellulaires) qu'il est possible d'étudier des phénomènes aussi généraux et fondamentaux en Biologie que le rôle du noyau dans la vie de la cellule, les mécanismes de la différenciation cellulaire, ceux de la division mitotique, etc. Le matériel embryonnaire présente un intérêt exceptionnel pour le radiobiologiste : nous savons encore bien peu de choses sur les effets des radiations aux stades précoces du développement, qu'il s'agisse de létalité immédiate ou différée, de malformations héréditaires ou non. Si les cellules (et les œufs) sont essentiellement constituées de macromolécules (protéines, acides nucléiques, graisses, glycogène, etc.) et d'eau, elles sont cependant plus qu'un simple mélange de ces macromolécules : celles-ci sont ordonnées de façon à constituer des membranes délicates, plastiques et changeantes, essentiellement « vivantes » : la microscopie électronique nous les montre sous une forme statique, dans les cellules « fixées », à un moment donné de leur vie, par des procédés qui assurent une bonne conservation des détails de l'ultrastructure. Les microscopes électroniques à haute résolution nous permettent maintenant de « voir » les macromolécules constitutives des cellules : ils forment le pont qui unit — et unira de plus en plus — la Biologie moléculaire à la Biologie cellulaire. D'autres techniques aident le cytologiste et l'embryologiste à approcher du niveau moléculaire : la cytochimie, qui permet de préciser la localisation intracellulaire des macromolécules, l'autoradiographie qui rend possible une étude dynamique et cinétique de la synthèse et du sort ultérieur de ces mêmes macromolécules. L'application de ces techniques cytochimiques et autoradiographiques au niveau du microscope électronique, à laquelle on travaille beaucoup dans le Laboratoire de Morphologie animale, devrait ouvrir la voie à la « Cytologie moléculaire » de demain. On comprend dès lors que l'étude de la cellule et celle de la différenciation embryonnaire ne puissent se faire que sur une base moléculaire.

Mais il ne suffit pas de préciser la localisation intracellulaire des macromolécules : il faut connaître leurs propriétés chimiques et physiques (donc, être capable de les isoler sous leur forme « native »), les mécanismes de leur synthèse et de leur dégradation. C'est là le rôle de la *Biochimie* et de la *Biophysique*, les Sciences qui nous permettent de savoir ce qui, à l'échelle moléculaire, est commun à tous les êtres vivants et ce qui les distingue les uns des autres. Le biochimiste peut isoler, sous une forme raisonnablement pure (la microscopie électronique l'aidera à s'en assurer), les divers constituants de la cellule (noyaux, mitochondries, ribosomes, etc.); il pourra, ensuite, les analyser et suivre leur métabolisme, c'est-à-dire les transformations qu'ils subissent au cours du temps. La puissance d'analyse des méthodes biochimiques et biophysiques l'emporte, sans nul doute, sur celle des techniques plus statiques de la cytochimie; mais les deux types de techniques peuvent — et doivent — se compléter l'une l'autre.

Si la Biochimie touche à la Cytologie et à l'Embryologie, elle est, d'autre part, étroitement liée à la *Génétique* : cette Science, qui fut d'abord strictement formelle, puis cytologique, est devenue maintenant biochimique et moléculaire. La nature intime des mutations génétiques nous apparaît de plus en plus clairement; elles constituent le meilleur moyen existant pour comprendre les étapes complexes du métabolisme d'un acide aminé, d'une vitamine ou d'un sucre; elles nous permettent de mieux comprendre aussi le mécanisme intime de la réplication du matériel chromosomiel et celui de la synthèse des protéines. C'est grâce à l'étude de « mutants » génétiques que nous commençons à comprendre comment débutent et s'arrêtent les synthèses des protéines spécifiques. En raison de l'extrême complexité des problèmes à étudier, l'analyse génétique n'acquiert toute sa puissance qu'à la condition de travailler sur un système biologique aussi simple que possible : le meilleur, à l'heure actuelle, est constitué par des bactéries infectées par des virus nucléoprotéiques (bactériophages).

Les signataires du présent rapport (J. Brachet, H. Chantrenne, M. Errera, R. Jeener et R. Thomas) sont, depuis de longues années, pleinement conscients de la nécessité d'attaquer les problèmes biologiques fondamentaux en utilisant des matériaux biologiques aussi variés que possible, tout en employant des techniques et des modes de raisonnement adaptés à chaque cas particulier. Nous irons, dans ce rapport, de la Génétique du phage aux réactions d'immunité chez le lapin, en passant par les bactéries, les extraits de cellules, les cellules intactes, les organismes unicellulaires, les œufs en voie de développement, etc. Il ne s'agit là que d'une dispersion apparente — que la variabilité du monde vivant rend, d'ailleurs, indispensable —, mais plutôt de « variations sur un même thème ». Le fil conducteur commun est le « dogme central » de la Biologie moléculaire, dont les aspects essentiels sont connus à certains d'entre nous depuis plus de 25 ans. On peut le schématiser de la manière suivante :



Le DNA (acide déoxyribonucléique) constitue le matériel génétique de la cellule; il peut soit se répliquer (lors de la division cellulaire), soit diriger la synthèse des protéines spécifiques de la cellule. Le contrôle de cette synthèse se fait en deux étapes successives : la « transcription » correspond à la synthèse des divers types d'acides ribonucléiques (RNA messagers, ribosomiaux et de transfert), qui sont copiés sur des segments spécifiques du DNA. Ce sont les RNA messagers (m-RNA) qui apportent l'information (ou message) génétique du chromosome au cytoplasme, où ils s'associent aux autres types de RNA (RNA ribosomiaux = r-RNA; RNA de transfert = t-RNA) pour former les « polysomes ». Ceux-ci sont les sites actifs de la synthèse des protéines cellulaires; c'est à leur niveau que le message génétique, apporté par les m-RNA est « lu » et « traduit » de manière à former une chaîne polypeptidique où les acides aminés s'ordonnent dans un ordre parfait.

Une autre question importante se pose encore : comment l'activité génétique est-elle contrôlée? Il n'est guère concevable que la totalité du DNA serve continuellement de matrice pour sa transcription : cela entraînerait la synthèse simultanée, à un rythme constant et maximal, de toutes les protéines cellulaires (des milliers, sans aucun doute). Des *mécanismes de régulation* doivent donc entrer en jeu pour assurer le fonctionnement ou le non fonctionnement (dérépression ou répression) de certains segments du DNA. Les hypothèses proposées dans le cas des bactéries par Jacob et Monod se heurtent déjà comme l'a montré R. Thomas, à certaines difficultés d'ordre génétique. Les choses deviennent bien plus compliquées lorsqu'on se pose la question suivante : comment se fait-il que certaines protéines spécifiques (l'hémoglobine des globules rouges, par exemple) sont synthétisées à des moments précis du développement et dans des régions bien localisées de l'embryon? Dans ces régions et à ces stades, des segments particuliers de la molécule de DNA doivent, de façon hautement spécifique, devenir disponibles pour la transcription (donc, être déréprimés). La question de savoir si les protéines basiques (les histones) qui sont normalement combinées au DNA chromosomiel, dans les cellules des organismes plus complexes que les bactéries, interviennent dans la régulation génétique lors de la synthèse de l'hémoglobine et de la différenciation cellulaire, est l'une de celles qui ont été étudiées dans le laboratoire de J. Brachet.

Un autre problème, qui n'est pas moins important, est à l'étude dans le service de R. Jeener : c'est celui de la synthèse de protéines spécifiques, les anticorps, en réponse à l'injection dans le sang des Mammifères, d'autres protéines, les antigènes. Cette réaction spécifique d'immunité est-elle la conséquence d'une mutation dans le DNA chromosomal, d'une dérégulation spécifique d'un segment de ce DNA, ou est-elle explicable par la structure moléculaire de l'antigène? Ces questions sont d'autant plus importantes pour le radiobiologiste qu'on sait que les rayons X abolissent les réactions immunologiques.

Enfin, il a été montré dès 1955, par J. Brachet et H. Chantrenne, que des cellules dont on a enlevé le noyau restent capables de synthétiser des protéines spécifiques : dans de tels cas, le contrôle de la synthèse protéique ne peut évidemment plus se situer au niveau de la transcription du DNA chromosomal. S'agit-il d'un contrôle au niveau des mécanismes de la traduction, de la lecture du message génétique? Ou bien, le contrôle ne s'exercerait-il pas par le truchement d'un DNA cytoplasmique (mitochondrial ou chloroplastique)? Ce DNA cytoplasmique, s'il existe réellement, peut-il être, lui aussi, transcrit et de ce fait être capable de diriger la synthèse de protéines spécifiques? Est-il capable de se répliquer en l'absence du noyau? Si oui, la synthèse du DNA cytoplasmique est-elle radiosensible au même titre que la réplication du DNA chromosomal?

Voilà, à titre purement exemplatif, quelques-unes des questions qui se sont posées à nous, au cours des cinq dernières années et auxquelles des réponses partielles ont pu être apportées. Chacun des rapports détaillés émanant des cinq laboratoires qui forment le « groupe de Rhode » est précédé d'un exposé introductif, où les problèmes qui se sont posés à chacun sont précisés. Nous nous limiterons donc ici à une brève esquisse des principaux problèmes qui ont été étudiés dans les divers laboratoires qui forment le groupe. Le lecteur intéressé pourra relire nos précédents rapports annuels; cette lecture lui permettrait de juger l'importance des progrès réalisés, grâce à l'existence du contrat d'association et de mesurer l'étendue des lacunes qui subsistent.

Dans le *Laboratoire de Génétique* (R. Thomas), on s'est surtout intéressé à l'analyse génétique du *contrôle de la réplication du DNA et de l'expression génétique* dans le cas des phages tempérés; un autre groupe de chercheurs, travaillant en liaison avec le *Laboratoire de Biochimie*, a étudié le rôle des ribosomes dans la *spécificité de la « traduction »* des chaînes polynucléotidiques (acides nucléiques) en chaînes polypeptidiques (protéines). Ces questions sont d'une importance fondamentale, car nous ignorons encore les facteurs, qui préoccupent tant les radiobiologistes et les cancérologues, qui mettent en route la synthèse du DNA et la division cellulaire. Nous ne savons pas non plus avec certitude si les ribosomes sont (ou non) tous identiques; s'ils ne l'étaient pas, le fait revêtirait une grande importance pour la compréhension de la différenciation cellulaire.

C'est l'analyse des *mécanismes biochimiques de la synthèse des protéines* qui constitue la principale préoccupation du *Laboratoire de Biochimie* (H. Chantrenne). On lui doit une découverte importante, l'*isolement du m-RNA de l'hémoglobine* : c'est la première fois qu'on arrive à isoler le « messenger » qui dirige la synthèse d'une protéine aussi importante que l'hémoglobine et à caractériser ses propriétés physiques (poids moléculaire, forme, aspect au microscope électronique) et chimiques (marquage rapide, composition en bases, sensibilité à l'action de la ribonucléase, etc.). En ce qui concerne le *contrôle des synthèses protéiques au niveau de la « traduction »*, des progrès importants ont été réalisés quant à la nature du « centre actif » d'un enzyme d'activation des acides aminés; les mécanismes du déchiffrement de l'information génétique par deux organes différents (le foie et les réticulocytes, issus de la moelle osseuse) sont aussi à l'étude. L'introduction d'une *base anormale* (l'azaguanine) dans les RNA des bactéries et l'étude des répercussions de la synthèse de ces RNA anormaux sur celle d'un enzyme (la pénicillinase) ont également permis de mieux préciser les mécanismes de la « traduction » : l'élaboration, dans la cellule, d'un RNA anormal conduit à la synthèse d'une protéine également anormale. Enfin, le *Laboratoire de Biochimie* s'est intéressé à la *synthèse induite d'enzymes* (cytochromes) sous l'influence de l'oxygène chez la levure : on retiendra, notamment, que les levures contiennent deux « isocytochromes-c », qui se synthétisent de façon différente.

Enumérons simplement les activités, nombreuses et variées, du *Laboratoire de Morphogénèse expérimentale et de Physiologie cellulaire* (J. Brachet) : la localisation, l'origine, la nature et le rôle possible du DNA présent dans le cytoplasme des œufs (oursins et Batraciens); les effets des hormones hypophysaires et corticosurrénales sur la synthèse des acides nucléiques dans des systèmes biologiques variés (œufs de Batraciens, foie et hypophyse des Mammifères); les effets de divers inhibiteurs sur la synthèse des acides nucléiques et sur celle des protéines, ainsi que sur la morphogénèse et l'ultrastructure des cellules embryonnaires; la régulation de la synthèse des protéines dans des fragments *anucléés* d'œufs d'oursin activés parthénogénétiquement; l'importance relative des synthèses de RNA et de protéines lors de la division cellulaire; le métabolisme nucléoprotéique et la production d'énergie chez les hybrides létaux entre Batraciens et entre oursins; l'indépendance des chloroplastes, chez l'algue unicellulaire *Acetabularia*, vis-à-vis du noyau cellulaire : présence de DNA chloroplastique, multiplication des chloroplastes en l'absence du noyau, synthèse autonome de DNA et de RNA dans les chloroplastes isolés; l'existence d'une synthèse nette de DNA et la formation de polysomes dans des fragments *anucléés d'Acetabularia*; les effets d'inhibiteur des synthèses des macromolécules (acides nucléiques et protéines) sur la morphogénèse et l'ultrastructure de cette algue; la composition des RNA présents dans les divers organites (nucléole, suc nucléaire, ribosomes, chloroplastes) qui sont présents dans l'algue; le rôle du noyau dans le contrôle du rythme photopériodique; le mécanisme de la biosynthèse des protéines basiques (histones) associées aux chromosomes; les effets de ces protéines sur la structure et le métabolisme des chromosomes; la réplication du DNA qui est présent dans le noyau et dans les mitochondries chez les Trypanosomes, etc.

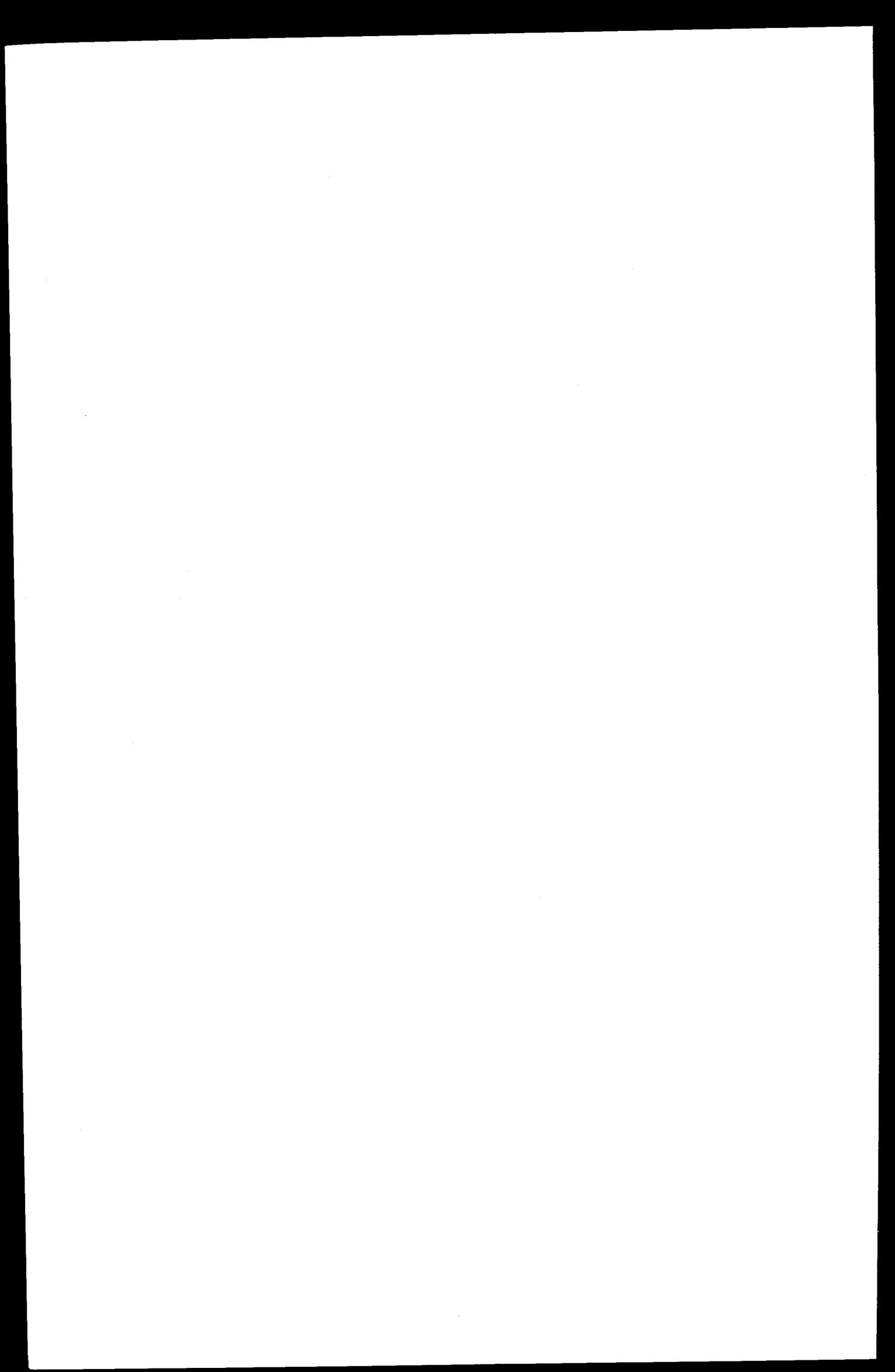
La *synthèse d'une protéine spécifique, l'hémoglobine* (qui intéresse vivement aussi, on l'a vu, le Laboratoire de Biochimie) au cours du développement de l'embryon de poulet, a été étudiée parallèlement dans les laboratoires de J. Brachet et de M. Errera (*Biophysique et Radiobiologie*). Une étude très complète des effets de l'actinomycine (un inhibiteur spécifique de la synthèse des diverses variétés de RNA) sur la synthèse de l'hémoglobine a, notamment, été réalisée dans le Laboratoire de Biophysique et Radiobiologie. Un autre problème important a fait l'objet de recherches approfondies dans ce même laboratoire : le mécanisme de *la synthèse des RNA dans des cellules humaines* cultivées *in vitro*. L'existence d'un hybride entre le DNA et le RNA, qui pourrait bien être un intermédiaire lors de la synthèse des RNA, a été établie par des observations biochimiques; tout récemment, le microscope électronique a permis de « voir » directement ces molécules hybrides. Enfin, le même laboratoire s'est intéressé, en collaboration avec celui de Génétique, à la *structure du DNA des microorganismes et des phages* : les effets des rayons X et de la chaleur sur la structure de ces DNA (qui ont été étudiés par autoradiographie et par microscopie électronique) ont été soigneusement analysés.

Quant à l'activité du *Laboratoire de Physiologie animale* (R. Jeener), elle s'est concentrée sur les problèmes d'*immunologie*, dont l'importance théorique et pratique ne peut échapper à personne. On trouvera, dans le rapport de ce Laboratoire, un exposé détaillé des bases théoriques du travail entrepris, qui vise à faire un choix définitif entre les deux théories opposées (instructive et génétique) qui cherchent à expliquer le mécanisme de la synthèse des anticorps spécifiques. Les nombreux faits recueillis font pencher la balance, de façon décisive semble-t-il, en faveur des théories génétiques. Les principales voies expérimentales adoptées ont été les suivantes : études immunogénétiques, analyse poussée de la synthèse des anticorps dressés contre le virus de la mosaïque du tabac, analyse biochimique de la structure des anticorps. Une fois de plus, l'utilisation combinée des techniques biochimiques et génétiques s'est avérée très fructueuse.

Qu'il nous soit permis de terminer par quelques chiffres : le travail des cinq laboratoires dont les activités viennent d'être esquissées s'est soldé, en cinq ans, par plus de 250 publications; parmi-celles-ci, plus de la moitié ont paru dans des revues internationales de haute réputation, dont les éditeurs sont connus pour leur sévérité; d'autres travaux proviennent de symposia, où les exposés ne se font que sur invitation.

On verra, dans une annexe aux rapports des divers laboratoires, que de nombreux chercheurs ont fait des séjours, brefs ou prolongés, à l'étranger et que de nombreuses conférences y ont été faites. Des relations particulièrement étroites et fructueuses ont été établies avec le Laboratoire de Génétique et Biophysique de Naples. On y verra aussi que certains chercheurs du groupe ont recueilli de flatteuses distinctions, sur le plan national et international (Prix scientifiques, Académies belges ou étrangères, etc.).

Il importe, enfin, de souligner qu'un intérêt constant pour la *formation des jeunes chercheurs* n'a cessé de se manifester : création, au sein de la Faculté des Sciences de l'ULB, d'une licence en Radiobiologie et d'une licence spéciale en Biologie Moléculaire (où 40 séminaires ont été donnés par divers membres des Laboratoires de Biochimie et de Génétique, au cours des trois dernières années académiques); participation importante aux cours de perfectionnement de l'Euratom en 1964, 1965 et 1966 (ce dernier a été entièrement organisé par les laboratoires du «groupe de Rhode»); enfin, plus de 60 séminaires ont été donnés, avec le concours de très nombreux chercheurs étrangers : de nombreux membres de toutes les Universités belges y ont souvent assisté.



## RAPPORT SUR L'ACTIVITE DES LABORATOIRES (années 1961-1966)

Laboratoire de Physiologie Animale  
par R. JEENER

Nous chercherons dans ce rapport à mettre en évidence la signification des résultats expérimentaux obtenus par le laboratoire de physiologie animale depuis cinq ans et à situer les conclusions auxquelles nous avons été conduits dans le rapide mouvement d'idées qui anime actuellement l'immunologie générale. Les résultats obtenus par des méthodes principalement immunogénétiques seront exposés séparément. Enfin une série de notes brèves résumeront des résultats dont l'intérêt pour l'étude ultérieure des problèmes envisagés apparaît dès à présent, sans qu'ils ne s'intègrent aisément dans les deux exposés précédents.

Le but principal que nous nous sommes assignés, en même temps que beaucoup d'autres chercheurs, est de profiter des succès de la biologie moléculaire dans l'étude de la synthèse des protéines pour faire progresser notre compréhension, encore totalement insuffisante, du mécanisme de la synthèse des anticorps spécifiques.

Ainsi que nous l'avons signalé, des arguments variés nous ont fait choisir dès 1963, à titre d'hypothèse de travail, une représentation «génétique» de l'origine de la spécificité des anticorps et écarter l'idée que l'information déterminant cette spécificité pourrait être apportée par l'antigène.

Nous n'avions à l'époque que des arguments indirects pour justifier cette attitude. Sa validité étant maintenant reconnue par l'immense majorité des chercheurs à la suite de la démonstration que la dénaturation complète des anticorps est réversible, nous ne discuterons plus la question dans le présent rapport.

L'idée que la spécificité des divers anticorps produits par un animal est le résultat de l'entrée en jeu d'autant de gènes distincts, et que ces anticorps diffèrent donc par leur structure primaire, est en principe susceptible de recevoir une démonstration directe. Les quatre chaînes polypeptidiques que comporte la molécule d'anticorps sont en effet assez courtes pour que la séquence des acides aminés qui les constituent puisse être déterminée. Une telle tentative de vérification n'est toutefois justifiée que si nous avons des raisons de croire que les anticorps comparés sont constitués chacun par un ensemble de molécules semblables, c'est-à-dire édifiées sous l'influence des mêmes gènes de structure. C'est cette condition que nous avons cherché à réaliser dès le début de nos recherches dans toute la mesure du possible.

L'antigène que nous avons le plus souvent utilisé est le virus de la mosaïque du tabac dont nous avons pu pousser à l'extrême la purification. Ses avantages principaux nous paraissent être que ce virus est constitué de sous-unités de même origine et de constitution identique, selon toute vraisemblance. Ces sous-unités, orientées de la même façon par rapport à l'axe de la particule de virus sont toutes en contact avec l'extérieur par leur seule extrémité apicale. Les déterminants antigénétiques du virus intact susceptibles de réagir avec les anticorps y sont nécessairement localisés. Ils ne peuvent être qu'en très petit nombre, compte tenu du nombre restreint d'acides aminés susceptibles de participer à leur constitution.

Les anticorps dressés contre ce groupe apical de déterminants ont été séparés en trois fractions de spécificités entièrement distinctes :

- (1) une fraction ne réagissant que si la thréonine C-terminale localisée dans la région apicale de la sous-unité est présente (anticorps anti-TMV thr<sup>+</sup>),
- (2) une fraction ne réagissant que si cette thréonine C-terminale a été éliminée par l'action de la carboxypeptidase (anticorps anti-TMV thr<sup>-</sup>),
- (3) une fraction n'ayant pas les deux caractéristiques précédentes.

La première de ces trois fractions (anticorps anti-TMV thr<sup>+</sup>) a été seule l'objet d'un examen approfondi, le déterminant antigénique correspondant paraissant le plus clairement défini puisqu'il comporte vraisemblablement la thréonine C-terminale de chaque sous-unité de TMV. Elle constitue 10 % de l'ensemble des anticorps anti-TMV.

Rappelons que l'isolement d'anticorps de spécificité restreinte à un seul déterminant antigénique n'a été tenté jusqu'à présent par la grande majorité des immunochimistes que par immunisation à l'aide d'antigènes hapténiques variés. L'espoir que la fraction des anticorps produits qui réagit avec l'haptène seul serait formée d'une espèce moléculaire unique, définie par sa spécificité ne s'est pas réalisé. Nous savons en effet à l'heure actuelle que la réaction entre un haptène et son anticorps ne peut être caractérisée par une seule constante d'association mais par un très large spectre de constantes. Une population d'anticorps dressés contre de tels antigènes est donc très hétérogène et nous devons imaginer que le nombre de cistrons impliqués dans leur synthèse est considérable. Un tel matériel ne peut donc convenir à des recherches structurales sur la nature de la spécificité des anticorps.

L'emploi du TMV comme antigène nous a permis de substituer à la méthode de l'équilibre de dialyse, utilisée dans la détermination de la constante d'association des anticorps antihaptènes, une méthode simple et commode dont le principe est le suivant<sup>14</sup>. On mélange diverses concentrations d'anticorps et de virus. On centrifuge pour séparer le TMV non combiné ou combiné à l'anticorps et les molécules d'anticorps libres. L'analyse de résultats par la théorie des équilibres multiples permet de caractériser la réaction en obtenant les renseignements suivants : unicité ou multiplicité des constantes d'association, évaluation d'un indice d'hétérogénéité, présence d'effets coopératifs, entropie de la réaction, enthalpie...

Les résultats obtenus (Mamet-Bratley<sup>14</sup>) opposent le TMV aux anticorps anti-haptènes étudiés jusqu'à présent. La réaction du TMV avec ses anticorps peut en effet être caractérisée par une seule constante ou par plusieurs constantes différant très peu. Un anticorps dressé contre un déterminant antigénique n'est donc pas nécessairement hétérogène en affinité. Dès lors l'hétérogénéité des anticorps anti-haptènes reflèterait simplement l'hétérogénéité des déterminants de l'antigène qui a servi à l'immunisation.

Sur la base de ce premier critère les anticorps anti-TMV pouvaient donc paraître beaucoup plus homogènes que les anticorps anti-haptènes et par conséquent constituer un matériel plus favorable à une comparaison des structures d'anticorps de spécificités différentes.

L'application d'autres critères d'homogénéité à l'étude de l'anticorps anti-TMV thr<sup>+</sup> a toutefois conduit à des résultats troublants.

On sait depuis les recherches classiques de Porter que les fragments réactifs univalents, obtenus par l'action de la papaine à partir des anticorps 7 S de lapin, peuvent être séparés par chromatographie sur CM cellulose en deux catégories (fragments I et II) et que ces deux sortes de fragments caractérisent deux types de protéines qu'il est possible de séparer sur colonne de DEAE-Sephadex (Sela).

Des fractionnements de ce genre ont été réalisés à notre laboratoire à partir d'anticorps anti-TMV thr<sup>+</sup> de constante de sédimentation 6,6 S, provenant d'un seul lapin, homozygote pour les déterminants allotypiques portés par les chaînes H et les chaînes L. Dans tous les cas,

ces anticorps étaient formés de molécules des deux types et fournissaient des fragments I et des fragments II en quantités comparables<sup>4</sup>.

Un examen du degré d'homogénéité de l'anticorps anti-thr<sup>+</sup> a été également entrepris par la mise en évidence des acides aminés N-terminaux des chaînes L à l'aide notamment de dinitrofluorobenzène <sup>14</sup>C, chromatographie en couche mince, et mesure de la radioactivité des dérivés obtenus<sup>17</sup>. Ces acides aminés terminaux se sont révélés être, outre l'alanine et l'acide aspartique déjà connus, l'acide glutamique, la sérine, la thréonine, la valine et la leucine (ou isoleucine) en quantités plus petites, mais notables. Ces mêmes acides aminés ont été retrouvés en proportions comparables dans d'autres anticorps et dans les  $\gamma$ -globulines 7S totales.

De nombreuses espèces de chaînes L participent donc apparemment à la constitution des molécules d'un anticorps de spécificité restreinte.

Ces constatations en rejoignent beaucoup d'autres faites indépendamment par de nombreux chercheurs sur des matériaux sans doute moins favorables. Nos résultats semblent conduire à la conclusion qu'une très nette hétérogénéité se manifeste même dans le cas d'un anticorps réagissant sélectivement avec un déterminant antigénique étroitement localisé et de structure constante, dont toutes les molécules sont apparemment caractérisées par la même constante d'association, appartiennent à la même classe d'immunoglobulines, et proviennent d'un seul animal, homozygote pour les déterminants allotypiques des chaînes H et L.

Cette hétérogénéité des anticorps exclut-elle actuellement toute possibilité d'analyse structurale directe de ce qui fait leur spécificité? Diverses hypothèses sur l'origine de cette hétérogénéité peuvent être faites actuellement. Suivant le choix qui sera fait entre elles, choix encore impossible, une réponse positive ou négative se trouvera donnée à cette question.

La première de ces hypothèses repose sur les résultats de l'étude de la séquence des acides aminés dans les chaînes L d'immunoglobulines d'origine pathologique (protéines de Bence-Jones, immunoglobulines produites dans les cas de myélomes). Ces chaînes L, apparemment très homogènes au sein d'un même individu, présentent suivant l'individu qui les fournit des différences portant sur de très nombreux acides aminés et localisées essentiellement dans la moitié N-terminale. Ces différences ne semblent pouvoir être interprétées que par l'existence au sein de chaque individu de très nombreux gènes de structure potentiellement capables de coder autant de chaînes L différentes. Dans chaque malade, l'un de ces gènes seulement manifesterait son existence en provoquant la synthèse de l'une des chaînes L possibles. Bien que nos connaissances sur la structure des chaînes H des protéines de myélomes soit beaucoup moins avancée il semble que nous pourrions nous trouver en ce qui les concerne dans une situation très analogue. Si l'hétérogénéité d'un anticorps de spécificité restreinte traduit le fait que la population de molécules qui le constitue est un mélange de protéines codées par de nombreux gènes de structure de chaînes H et L, aussi différents entre eux que ceux qui manifestent leur existence dans la détermination des immunoglobulines de myélomes, découvrir ce que toutes ces molécules ont en commun dans la région de leur groupe réactif paraît une entreprise sans espoir.

Une hypothèse moins décourageante peut heureusement être faite actuellement. Il paraît de plus en plus vraisemblable que la portion très variable de la chaîne H (fragment Fd) joue un rôle prépondérant dans l'édification du groupe réactif des anticorps alors que sa portion Fc, de structure constante, n'y participe pas.

L'hypothèse a été présentée de diverses côtés, et cela sur la base d'arguments de valeur incontestable, que les fragments Fd et Fc des chaînes H seraient issus de gènes distincts, les chaînes polypeptidiques correspondantes étant secondairement unies par un processus enzymatique particulier, ou lues l'une à la suite de l'autre après intégration des deux gènes en une unité fonctionnelle. Cette hypothèse nous permettrait de rendre compte des deux faits, en apparence contradictoires, auxquels nous a conduit l'étude de l'anticorps anti-TMV thr<sup>+</sup>: le fait que cet anticorps présente une constante d'association unique ou des constantes de valeurs

très proches d'une part, l'existence au sein de la population de molécules qui le constitue d'une hétérogénéité de composition (chaînes L) et d'une hétérogénéité des caractéristiques chromatographiques (groupes Fab). Nous pourrions nous représenter en effet que la constante d'association unique traduit le fait que tous les fragments Fd sont identiques et résultent de l'entrée en jeu d'un seul gène, mais que ces fragments sont associés à des fragments Fc et des chaînes L d'origines génétiques diverses.

Si une telle conception est exacte, des études structurales sur l'origine de la spécificité redeviennent possible à condition de se limiter à l'étude des fragments Fd. C'est sur cette base qu'ont été ébauchées récemment des recherches par notre laboratoire.

Une purification satisfaisante des fragments Fd de l'anticorps anti TMV thr<sup>+</sup> n'a pas été possible jusqu'à présent mais les essais nécessaires sont poursuivis par diverses méthodes. En attendant la réussite de cette purification, l'étude des peptides tryptiques des fragments Fd a été poursuivie par comparaison entre les finger-prints fournis par les peptides de la chaîne H et ceux fournis par les peptides de son fragment Fc (obtenu par l'action de la papaine sur la molécule entière). La même comparaison a été parallèlement effectuée sur les  $\gamma$ -globulines 7S totales.

A titre de première approximation, et dans le but de rendre possible l'examen d'un anticorps très spécifique comme l'anti-TMV thr<sup>+</sup> qui ne peut être préparé à partir d'un seul animal qu'en très petites quantités, une iodation des anticorps ou  $\gamma$ -globulines totales par <sup>131</sup>I. a toujours précédé la séparation des chaînes H et leur digestion par la trypsine. Les finger-prints obtenus ont ainsi pu être révélés par autoradiographie, les peptides détectés étant uniquement ceux contenant de la tyrosine, et probablement de l'histidine. Les images obtenues par cette méthode extrêmement sensible étaient très simples et la définition excellente.

Que la méthode de révélation utilisée soit la méthode classique à la ninhydrine, ou cette méthode autoradiographique, nous devons nous attendre à ce que la mise en évidence d'un peptide dans une préparation effectuée à partir d'un mélange de protéines diverses dépende essentiellement du nombre de molécules qui le contiennent. Il n'est pas étonnant que les chaînes H des  $\gamma$ -globulines totales soient identiques à part trois taches supplémentaires dans les chaînes H. Ce résultat confirme en effet l'opinion très répandue que la portion des chaînes H correspondant au fragment Fc est de structure fort semblable dans toutes les  $\gamma$ -globulines 7S. L'absence presque complète de peptides détectables fournis par les fragments Fd s'explique tout aussi bien si nous admettons que ces fragments sont de structures extrêmement diverses, et chacun des peptides qu'il fournissent trop peu abondant pour être mis en évidence, bien que l'échelle de sensibilités donnée par la méthode autoradiographique (temps d'exposition largement variable) soit beaucoup plus étendue que dans le cas d'une révélation par la ninhydrine.

Il devient dès lors très frappant que les autoradiogrammes réalisés avec les mêmes quantités totales de peptides, ceux-ci étant obtenus cette fois à partir des chaînes H entières de l'anticorps anti-TMV thr<sup>+</sup>, révèlent, en plus des peptides fournis par les chaînes H des  $\gamma$ -globulines totales, un nombre élevé de peptides supplémentaires, présents en quantités comparables à celles des peptides de la portion Fc, et détectables sous forme de tâches aussi clairement séparées. Ces peptides supplémentaires ne peuvent provenir que des fragments Fd de l'anticorps et témoignent de la grande homogénéité de ceux-ci.

Dans l'état actuel de nos expériences le nombre de ces peptides n'est que deux fois supérieur au nombre attendu si les fragments Fd étaient entièrement homogènes et les peptides contenant de la tyrosine seuls détectés. Nous croyons pouvoir conclure dès à présent à une grande homogénéité des fragments Fd de l'anticorps étudié.

Ce premier pas dans la voie d'une analyse structurale d'une portion au moins des anticorps de spécificité très restreinte nous paraît en tout cas assez encourageant pour nous inciter à poursuivre nos recherches sur le système choisi et d'autres de mêmes caractéristiques.

La direction de recherche qui vient d'être décrite ne donnera vraisemblablement des résultats définitifs qu'après de très grands efforts et dans des délais difficilement prévisibles. Une des voies par laquelle des progrès plus rapides pourraient être accomplis, nous a semblé la suivante.

On sait depuis 20 ans que la réaction de l'animal à l'injection d'un antigène ne se traduit pas seulement par l'apparition d'anticorps dans le sang, mais également par une élévation de la concentration en  $\gamma$ -globulines n'ayant pas de spécificité connue (« $\gamma$ -globulines non spécifiques»). Il semble qu'une hypothèse satisfaisante sur le mécanisme de la synthèse des anticorps devrait fournir une explication de ce fait singulier.

L'interprétation de variations de la concentration d'une protéine dans le sang est toujours très délicate vu la multiplicité des facteurs dont cette concentration paraît dépendre. Le problème est notablement simplifié lorsque la vitesse de production de cette protéine est déterminée par la mesure de l'incorporation en un temps court d'un acide aminé marqué. C'est cette technique que nous avons constamment utilisée.

Une hyperimmunisation du lapin par le TMV se traduit par une élévation progressive de la teneur en anticorps du sang d'une durée d'une vingtaine de jours. Cette période préliminaire est suivie d'une autre qui peut durer de nombreux mois et pendant laquelle la concentration en anticorps ne s'abaisse le plus souvent qu'avec une extrême lenteur. Cette situation, assez exceptionnelle, nous offre la possibilité d'étudier un système restant relativement stable pendant fort longtemps. Le rapport existant entre la vitesse de synthèse des  $\gamma$ -globulines non spécifiques et celle des anticorps, après avoir montré une valeur élevée peu de temps après l'immunisation, décroît rapidement, et, après une vingtaine de jours, atteint la valeur de 1. Celle-ci se maintient ensuite pendant des mois. Que des facteurs régulateurs extracellulaires (rétrocontrôle dépendant de la composition du sang, facteurs hormonaux, etc...) interviennent pour maintenir cette situation est rendu peu vraisemblable par le fait que des fragments de rate, provenant d'animaux dans cet état stable et cultivés *in vitro* en l'absence de sérum, produisent à une vitesse égale les deux sortes de protéines pendant 9 à 12 jours<sup>12,16</sup>.

La seule hypothèse qui nous paraisse rendre compte de ces faits est que les cellules productrices d'anticorps se conduisant comme si elles étaient hétérozygotes, l'un des allèles d'un couple de gènes coderait l'anticorps, ou plus exactement sans doute la partie de l'anticorps responsable de sa spécificité (chaînes H ou fragments Fd), l'autre un polypeptide fort semblable, différent toutefois du premier par l'absence du déterminant de cette spécificité. Des expériences récentes ayant montré qu'un anticorps et les  $\gamma$ -globulines non spécifiques incorporaient avec la même vitesse un acide aminé marqué chez des souris Balb-C provenant d'un élevage maintenu en inbreeding depuis de très nombreuses générations et hyperimmunisées contre le TMV, la différence existant entre les deux gènes de la paire considérée dans notre hypothèse a beaucoup de chances d'être le résultat d'une mutation somatique. Dans notre esprit, la production à des vitesses égales d'un anticorps et de  $\gamma$ -globulines non spécifiques dans tous les cas d'hyperimmunisations que nous avons étudiés serait donc une démonstration de plus de la validité de la théorie de la sélection clonale de Burnet.

Les implications de nos expériences paraissent importantes, toute une série de recherches complémentaires s'imposaient.

Il est très généralement admis que les cellules plasmatiques de la rate et des ganglions lymphatiques sont le principal lieu de production des  $\gamma$ -globulines. Ces cellules peuvent être très aisément mises en évidence par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dressé, par exemple, contre les chaînes L de ces  $\gamma$ -globulines. Toute cellule productrice de  $\gamma$ -globuline spécifique ou non sera ainsi clairement détectable. D'autre part, si le tissu a été préalablement traité par du TMV, toute cellule productrice de l'anticorps spécifique fixera du TMV et celui-ci pourra à son tour fixer un anticorps anti-TMV portant un colorant différent.

Les recherches effectuées par cette méthode sont en cours et assez loin d'être terminées. Elles exigent en effet la comparaison d'un nombre élevé de cas parmi lesquels les plus frappants paraissent paradoxalement être ceux où le rapport existant entre la vitesse de synthèse des anticorps et des  $\gamma$ -globulines non spécifiques s'écarte le plus de l'unité, valeur que nous avons trouvée dans la grande majorité des expériences dont il est fait état ci-dessus. Il semble en effet actuellement que le rapport existant entre le nombre de cellules produisant l'anticorps et le nombre de cellules ne produisant que des  $\gamma$ -globulines non spécifiques varie comme le rapport des vitesses de synthèse des deux sortes de protéines. C'est là le résultat auquel nous devons nous attendre si chaque cellule ne met en œuvre que l'un des deux gènes alléliques supposés dans notre hypothèse intervenir dans la synthèse des anticorps et des  $\gamma$ -globulines non spécifiques. Cette conclusion, assez surprenante à première vue, est en parfait accord avec de nombreuses données issues de l'immunogénétique (voir note annexe) et de l'étude des immunoglobulines produites dans les cas de myélomes (Valette, Vansanten).

D'autre part, l'hypothèse que la production par l'animal hyperimmunisé de quantités de  $\gamma$ -globulines non spécifiques et d'anticorps à des vitesses égales est due à ce que les deux espèces de protéines sont codées par des gènes alléliques, dont la moitié seulement porte le caractère de spécificité de l'anticorps, implique qu'un changement qualitatif des  $\gamma$ -globulines non spécifiques accompagne cette hyperimmunisation.

Les expériences projetées à notre laboratoire sur cet aspect du problème s'appuient sur une constatation déjà ancienne. Ainsi que Pappenheimer et ses collaborateurs l'ont montré il y a 20 ans l'antitoxine diphtérique d'un cheval hyperimmunisé est localisée dans une fraction protéique homogène donnant naissance par électrophorèse à un pic étroit, de mobilité très caractéristique et quasiment absent dans une électrophorèse de sérum normal. La purification de cette fraction, poussée fort loin par les auteurs, livre une population de molécules de propriétés physico-chimiques très semblables, mais dont la moitié seulement réagit avec l'anticorps. Dans ce cas fort clair la production d'un anticorps de propriétés physicochimiques très particulières est donc accompagnée d'une hyperproduction massive de protéines fort semblables mais non spécifiques, dont la présence est à peine détectable avant l'immunisation.

Nos connaissances actuelles sur de multiples aspects de l'hétérogénéité des immunoglobulines devrait permettre de retrouver beaucoup de faits du même genre si notre interprétation du lien existant entre la production des anticorps et celle des immunoglobulines non spécifiques est exacte.

## NOTES ANNEXES

### 1 — TRAVAUX D'IMMUNOGENETIQUE

(R. Hamers, C. Hamers-Casterman, S. Lagnaux et C. Renneboog)

L'étude des aspects génétiques du problème posé par la synthèse des anticorps a été entreprise parce que nous avons la conviction que cette connaissance était une voie d'accès à la compréhension de l'origine de la spécificité.

L'essentiel de notre activité au cours des dernières années a été consacrée à l'analyse des gènes de structure des immunoglobulines et à une tentative d'éclaircir la confusion qui régnait dans le domaine. Nous avons mis en évidence, chez le lapin, l'existence d'une classe nouvelle d'IgG caractérisée par un marqueur allotypique As8 génétiquement lié à As1 localisé sur le fragment Fc (J. Mol. Biol. 14, 288-289, [1965] - Immunology 10, 399-408 [1966]). Afin de pouvoir concilier ces nouvelles données avec des données immunogénétiques déjà acquises tant pour le lapin que pour l'homme et la souris, nous avons retenu le schéma général, proposé par Kunkel pour l'homme, comportant des gènes de structure différents pour chacune des chaînes polypeptidiques des différentes classes, sous-classes ou types d'immunoglobulines.

Les recherches actuellement en cours visent à faire accepter ce schéma par un apport de faits expérimentaux nouveaux (voir les rapports trimestriels).

Nous cherchons à déterminer sur quelle chaîne polypeptidique des différentes classes, sous-classes ou types d'immunoglobulines et dans quelle région de celle-ci se trouvent les marqueurs allotypiques connus.

Si le schéma de Kunkel est le reflet réel de la situation génétique, il rend très difficile, de par sa complexité, la conception d'une expérience claire qui permettrait de faire un choix entre les hypothèses de type «germinatif» et les hypothèses de type «somatique» de l'origine de la spécificité des anticorps. Certains faits expérimentaux dont le choix entre ces hypothèses doit tenir compte peuvent cependant être précisés : une expérience en cours est destinée à établir clairement si la chaîne polypeptidique A est synthétisée en deux pièces séparées ou non : il s'agit de savoir si les chaînes A appartenant à des classes différentes d'immunoglobulines peuvent porter le même marqueur génétique correspondant à une éventuelle partie commune à toutes ces chaînes, comme le prétendent Stemke et Todd. L'étude des déterminants allotypiques débouche sur des problèmes plus généraux de régulation du fonctionnement des gènes. Les aspects particuliers de la régulation de la synthèse des immunoglobulines sont peut-être directement attribuables au mécanisme qui engendre leur spécificité.

Un aspect de cette régulation a déjà été abordé (disparité dans le nombre des molécules portant les divers marqueurs allotypiques pour un anticorps spécifique) (Archives Int. de Physiol. Bioch. 72, 685-686 [1964]).

Les aspects de ce phénomène dont l'étude semble la plus intéressante sont :

1. le fait qu'un seul des deux gènes de structure alléliques responsables des allotypes fonctionne dans une cellule,
2. le fait qu'une seule catégorie de chaîne A et une seule catégorie de chaîne B sont synthétisées par une cellule à un moment déterminé.

C'est dans cette direction que notre recherche évoluera vraisemblablement.

## 2 — CARACTERISTIQUES DE LA REACTION ENTRE LE TMV ET LES FRAGMENTS MONOVALENTS ANTI-TMV

(J. Urbain)

L'idée qu'un seul déterminant induit la synthèse d'une population d'anticorps très hétérogène en affinité est très largement répandue. Cette idée est principalement basée sur le fait que la réaction entre un haptène et son anticorps ne peut être caractérisée par une seule constante d'association mais par un large spectre de constantes différentes. Ce spectre de constante oppose les anticorps très hétérogènes aux enzymes beaucoup plus homogènes.

A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature, des expériences montrant l'existence d'un tel spectre de constantes pour un enzyme. Toutefois la réaction entre un enzyme et son substrat très souvent ne peut-être caractérisée par une seule constante : il y a plusieurs constantes dues aux effets coopératifs, à une tautomérie de configuration, etc. L'opposition enzyme-anticorps a tellement frappé les immunologistes que certains ont postulé un mécanisme différent de biosynthèse pour les anticorps (Karush, Eisen).

Toutefois deux points méritent de retenir notre attention : en premier lieu les enzymes ne montrent pas l'hétérogénéité des anticorps parce que leur méthode de préparation pourrait très bien être une sélection; en second lieu, le déterminant antigénique pourrait être plus grand que l'haptène et dès lors l'hétérogénéité des anti-corps anti-haptène pourrait refléter l'hétérogénéité des déterminants.

Ces faits ont évidemment une grande importance théorique et expérimentale. Le nombre de cistrons impliqués dans la synthèse des immunoglobulines est considérablement accru. Le large spectre d'affinité des anticorps anti-haptène est-il une constante fondamentale de la réponse immunologique ou est-ce un phénomène accessoire surimposé à l'hétérogénéité qui serait beaucoup plus restreinte d'un anticorps monospécifique? Les motifs du choix du TMV antigène dans nos recherches, les méthodes utilisées, les résultats obtenus à partir d'une étude de l'anticorps total non fractionné ont été exposés dans l'introduction. Il sera seulement rappelé ici que la réaction n'est pas caractérisée par le large spectre de constantes et que dès lors celui-ci ne peut représenter une constante fondamentale de la réponse immunologique.

Néanmoins des objections subsistent quant à la validité de ces conclusions. Comme ces objections sont basées sur la théorie des équilibres multiples, elles ne peuvent être exposées ici. Nous dirons simplement que la méthode des précipitations successives permet de répondre à ces objections. Cette méthode consiste dans l'addition à un antisérum donné de quantités d'antigène, plus petite que la quantité d'antigène nécessaire pour précipiter tout l'anticorps et dans l'isolement des anticorps des précipités successifs. Cette méthode permet de fractionner d'une manière arbitraire et avec un degré de résolution voulu, une population de molécules d'anticorps caractérisé par un large spectre de constantes indépendantes.

Nous avons donc fractionné les anticorps dressés contre le virus de la mosaïque du tabac (TMV) par cette méthode. Les fragments monovalents (Fab) ont été isolés dans chaque fraction et nous avons déterminé leurs constantes d'association dans toutes. Nous avons observé que d'une part, l'ordre de grandeur des constantes est le même dans toutes les fractions, ce qui confirme le travail de Mamet (1966), d'autre part, que l'ordre apparent de la réaction varie avec le degré de saturation de l'anticorps et montre en outre l'existence d'interactions coopératives.

La première observation confirme ce qui a été dit plus haut. Quant à la seconde observation, elle impliquerait l'existence de plusieurs isomères de configuration en équilibre lent. Le déterminant induirait dans l'anticorps un changement de conformation dont les temps de relaxation seraient plus grands que la durée de vie moyenne du complexe antigène-anticorps. A bas degré de saturation, l'anticorps aurait le temps de retourner à sa configuration initiale avant de rencontrer un autre ligand; à haut degré de saturation (c'est-à-dire que l'anticorps passe pratiquement tout son temps à l'état combiné avec l'antigène), l'anticorps n'aurait pas le temps de retourner à sa forme initiale et resterait sous la forme induite; si la forme induite a une constante plus élevée que la forme initiale, les effets coopératifs seraient ainsi aisément expliqués.

Des faits similaires ont été mis en évidence, dans d'autres laboratoires, pour d'autres protéines.

Il est remarquable que l'anticorps anti-TMV présente exactement la même hétérogénéité que les enzymes. Ce fait renforce l'idée que l'hétérogénéité des anticorps anti-haptènes représente une perturbation supplémentaire aux caractéristiques fondamentales de la réponse immunologique.

Les implications des phénomènes de relaxation décrits ci-dessus sont multiples. Ils fournissent un modèle de mémoire à courte durée à l'échelle moléculaire. Ils montrent que la symétrie d'une structure quaternaire n'est pas une condition nécessaire à l'existence d'effets coopératifs. Une population de molécules de protéine serait composée d'isomères en équilibre lent, modifiable par des ligands : il y aurait donc un compromis entre la souplesse et la rigidité, la souplesse étant due à la possibilité de changements de conformation, la rigidité étant liée aux temps longs d'équilibration entre les différentes formes.

### 3 — RECHERCHES SUR LA SYNTHÈSE D'ANTICORPS ANTI-TMV NON PRECIPITABLES PAR L'ANTIGÈNE INJECTÉ

(F. Loor)

Le problème posé par le caractère spécifique des anticorps produits en réponse à l'injection d'un antigène se trouverait profondément modifié dans ses données mêmes si, comme l'a déjà montré Najjar, cette injection pouvait faire apparaître simultanément des anticorps spécifiques d'un antigène différent.

Nous avons eu la chance de découvrir un cas semblable à ceux mis en évidence par Najjar et plus susceptible, semble-t-il, de nous amener à une interprétation cohérente des faits observés par Najjar et nous mêmes <sup>21</sup>.

En effet, il est apparu que l'injection de TMV thr<sup>+</sup> faisait apparaître les trois types d'anticorps décrits dans la première partie de ce rapport, soit à la fois : des anti TMV thr<sup>+</sup>, des anti TMV thr<sup>-</sup> et des anticorps n'ayant pas ces caractéristiques. La présence d'anti TMV thr<sup>-</sup> dans ces sérums correspond donc à un cas semblable à ceux décrits par Najjar : celui d'un anticorps dressé contre un antigène non injecté. L'objection que cette synthèse d'anti TMV thr<sup>-</sup> pourrait en fait dépendre de l'élimination *in vivo* de la thréonine C-terminale du TMV thr<sup>+</sup> injecté est fondée. Nous avons nous-mêmes constaté que le TMV thr<sup>+</sup> après injection perdait rapidement la thréonine C-terminale avant d'être complètement dégradé. Cependant l'injection de TMV totalement déthréoninisé est, elle-aussi, suivie de la synthèse des trois types d'anticorps. Il est totalement exclu d'expliquer cette fois l'apparition des anti-TMV thr<sup>+</sup> par une adjonction de thréonine au TMV thr<sup>-</sup> injecté. Il semble donc acquis qu'un animal donné, qu'il soit injecté de TMV thr<sup>+</sup> ou de TMV thr<sup>-</sup>, synthétise toujours simultanément les trois types d'anticorps anti TMV dans des proportions variables d'un animal à l'autre, mais avec, pour chaque animal, un rapport relativement constant au cours du temps entre l'anti TMV thr<sup>+</sup> et l'anti TMV thr<sup>-</sup>. Parallèlement, nous avons été amenés à comparer l'immunogénicité de deux antigènes fort semblables : le TMV intact d'une part, le TMV reconstitué à partir de ses sous-unités et dépourvu de RNA ou ces sous-unités elles-mêmes d'autre part. Il est apparu que ces deux dernières préparations ont une immunogénicité identique, et essentiellement différente de celle du TMV intact : elles ne font apparaître qu'une synthèse d'anticorps faible et de courte durée. Quant à la spécificité, le TMV thr<sup>+</sup> dépourvu de RNA fait apparaître les trois types d'anticorps habituels. Nous connaissons la réponse du lapin à une injection de TMV thr<sup>-</sup> dépourvu de RNA d'ici quelques semaines. En outre, la fixation des sous-unités dans les cellules du ganglion poplité étant plus d'une dizaine de fois inférieure à celle du TMV intact, et leur vitesse d'élimination étant deux fois plus grande, il apparaît que la cause de l'immunogénicité moindre des sous-unités, en l'absence de RNA, réside dans la persistance plus brève de cet antigène.

L'interprétation de ces résultats nous paraît pouvoir être la suivante. L'antigène aurait au moins deux fonctions immunologiques distinctes : 1. provoquer la synthèse des anticorps correspondants par une dérégulation des gènes convenables et l'entretien de la multiplication des cellules des clones ainsi différenciés. 2. réagir avec ces anticorps. La configuration d'acides aminés assurant la première fonction serait le « site immunogénique de l'antigène », celle assurant la seconde étant le déterminant antigénique classique.

En effet, sur chaque unité élémentaire du TMV, le nombre d'acides aminés pouvant contribuer à l'élaboration de déterminants antigéniques, c'est-à-dire accessibles à l'anticorps et situés à l'extérieur de la particule virale, est nécessairement restreint alors que le nombre de déterminants antigéniques paraît élevé.

Il serait donc logique d'imaginer que ces déterminants se recouvrent partiellement. Dès lors, leur région commune pourrait constituer un site immunogénique ayant la propriété d'initier et d'entretenir la synthèse des divers anticorps correspondants à ces déterminants. Il suffirait

pour cela qu'une portion du groupe réactif de chacun de ces anticorps soit complémentaire de leur site immunogénique commun.

Que le TMV injecté possède ou non ses thréonines C-terminales, le site immunogénique provoquerait la prolifération de tout clone de cellules et la dépression de tout gène capable de synthétiser l'un des anticorps dressés contre les déterminants antigéniques ayant le site immunogénique en commun, c'est-à-dire notamment les anti TMV thr<sup>+</sup> et les anti TMV thr<sup>-</sup>.

En poussant à l'extrême l'hypothèse présentée, nous arriverions à concevoir le déterminant antigénique classique comme un groupe de configurations se superposant partiellement. De même les anticorps se présenteraient en familles ayant en commun une portion de leurs groupes réactifs. Au sein de ces familles d'anticorps des réactions croisées pourraient exister fréquemment. Nous expliquerions peut être ainsi la microhétérogénéité dont peuvent témoigner les anticorps de spécificité très restreinte, tel le TMV thr<sup>+</sup> de singe, dont il a été montré à notre laboratoire (Lanckman) qu'il contenait plusieurs types de chaînes H différentes par leur N-terminal.

#### 4 — EXISTENCE PROBABLE D'UN ISOMERISME DE CONFIGURATION DES ANTICORPS

(C. Szpirer)

L'hétérogénéité de structure primaire des molécules d'anticorps réagissant avec un seul déterminant antigénique est aujourd'hui reconnue (voir le rapport général).

A la suite d'expériences de fractionnement d'anticorps dressés contre le virus de la mosaïque du tabac, nous avons été conduits à penser qu'à cette hétérogénéité viendrait s'en superposer une autre résultant du fait qu'une molécule d'anticorps pourrait exister sous plusieurs configurations en équilibre<sup>18</sup>. En effet, on peut séparer l'ensemble des anticorps anti-TMV fixés à l'antigène en un nombre arbitraire de fractions : celles-ci sont obtenues à partir d'un précipité immunologique qui est soumis à l'action de solutions d'acétate 1 M de pH acide décroissant; une fraction isolée dans un intervalle étroit de pH révèle un comportement semblable à celui de la population totale d'anticorps dont elle est issue. Ces expériences ne semblent pouvoir s'interpréter que par l'existence, pour chaque molécule d'anticorps de plusieurs formes de configurations différentes et en équilibre; ces formes montreraient une sensibilité variable à l'environnement ionique. L'existence de ces états tautomériques ne semblent pas être liée à l'intégrité de la molécule : des fragments univalents (fragments I et II de Porter) montrent en effet un comportement aussi hétérogène que celui des molécules entières.

L'existence, chez des protéines globulaires de plusieurs formes tautomériques a déjà été suggérée par divers auteurs. Les molécules d'anticorps présenteraient donc également cette hétérogénéité de conformation qui viendrait se superposer à l'hétérogénéité des structures primaires. Notons que d'autres résultats obtenus dans le laboratoire semblent devoir s'expliquer également par un tel phénomène.

#### 5 — RECHERCHES SUR DES MODIFICATIONS DES DETERMINANTS ANTIGENIQUES DU TMV ENTRAINEES PAR L'INCORPORATION DE THIOURACILE DANS L'ACIDE RIBONUCLEIQUE DU VIRUS

(R. Jeener)

Ces recherches s'insèrent dans un ensemble d'essais sur les effets exercés par une série d'enzymes et d'analogues de bases puriques et pyrimidiques susceptibles de modifier les propriétés de l'acide nucléique des phages ou du TMV et d'entraîner ainsi des changements des caractéristiques immunologiques de leurs constituants protéiques<sup>2,3,4,11</sup>. Nous ne reparlerons

ici que des résultats obtenus par l'action du thiouracile<sup>10</sup>. Ce sont en effet les seuls qui intéressent, indirectement il est vrai, l'étude des anticorps, objet du présent rapport et activité essentielle du laboratoire pendant l'exécution du contrat. Nous avons pu montrer que le remplacement d'un seul uracile en moyenne par molécule de RNA du virus par du thiouracile avait pour conséquence la disparition d'un tiers des déterminants antigéniques portés par les protéines. L'analyse détaillée de ce résultat nous a conduits à l'hypothèse que cette faible incorporation de thiouracile ne pouvant conduire qu'au remplacement d'un acide aminé par chaîne, et que ce remplacement se produisant indifféremment en de nombreux points de celle-ci, ces modifications très diverses de la structure primaire de la protéine devaient avoir pour conséquence dans de très nombreux cas, et souvent à longue distance, une modification de la structure tertiaire de la région apicale de la molécule, seule à pouvoir porter les déterminants antigéniques étudiés.

Si la structure spécifique d'un déterminant antigénique est aussi sensible à des remplacements d'acides aminés localisés en dehors du déterminant lui-même, nous devons considérer qu'il peut en être de même pour le groupe réactif de l'anticorps dont la spécificité repose sur l'existence d'une structure complémentaire, sans doute de même type.

Nous pouvons donc conclure que les mutations somatiques, qui seraient responsables de la spécificité des anticorps dans une théorie sélective du type proposé par Burnet, pourraient porter sur de nombreux points des chaînes H et L, et pas seulement sur les régions de ces chaînes constituant le groupe réactif. Les difficultés d'une théorie somatique de l'origine de la spécificité des anticorps se trouvent ainsi atténuées puisque le nombre de mutations supposées efficaces s'accroît considérablement dans pareille hypothèse.

## 6 — PUBLICATIONS

- 1 — Y. ROBIN — Relation entre la teneur des cellules de *Bacillus megaterium* en acide ribonucléique non ribosomal et la vitesse de synthèse des protéines, *Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 556-557, (1962).
- 2 — N. DUPONT-MAIRESSE — On the abnormal character of phage precursor proteins synthesized in presence of ribonuclease, *Biochim. Biophys. Acta.*, **61**, 129-134, (1962).
- 3 — R. JEENER and G. VANSANTEN — On the Structural Alterations of Phage Proteins Synthetized in the Presence of Pancreatic Ribonuclease, *Virology* **19**, 169-178, (1963).
- 4 — G. VANSANTEN, S. LAGNAUX, R. HAMERS, R. JEENER — Two types of antibody molecules of identical restricted specificity regularly present in individual rabbits, *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 433-435, (1964).
- 5 — C. HAMERS-CASTERMAN, M. LAGNAUX et R. HAMERS — Sur la signification possible de l'absence d'un des allotypes dans les anticorps, *Arch. Intern. de Physiol. et de Bioch.* **72**, 685-686, (1964)
- 6 — Y. VALETTE-ROBIN — Un essai de contrôle expérimental des théories sélectives de la synthèse des anticorps, *Arch. Intern. de Physiol. et de Bioch.* **72**, 700-701, (1964)
- 7 — R. HAMERS, C. HAMERS-CASTERMAN et A.S. KELUS — Un gène nouveau intervenant dans la synthèse de la  $\gamma$ -globuline du lapin. *Arch. Intern. de Physiol. et de Bioch.*, **73**, 147-148, (1964).
- 8 — M. GRENSON — Physiology and cytology of chloroplast formation and "loss" in euglena, *Intern. review of Cytology*, **16**, 37-59, (1964).

- 9 — G. VANSANTEN — Phenotypic character of phage protein abnormalities induced by bromouracil, *Biochemical Pharmacology*, **14**, 215-222, (1965).
- 10 — R. JEENER — Effects on the antigenic determinants of tobacco mosaic virus of a small number of base replacements in the ribonucleic acid, *Virology*, **26**, 10-15, (1965).
- 11 — R. HAMERS — Les immunoglobulines chez les mammifères, *Arch. Intern. de Physiol. et de Bioch.*, **73**, 544-546, (1965).
- 12 — Y. VALETTE-ROBIN, N. DUPONT-MAIRESSE and R. JEENER — A relation between antibody and non-specific  $\gamma$ -globulin production predictable by the clonal selection theory of the immune reaction, *B.B.R.C.*, **20**, N° 5, 600-605, (1965).
- 13 — R. HAMERS, C. HAMERS-CASTERMAN — Molecular localization of a chain allotypic specificities in rabbit IgG (7S  $\gamma$ -globulin), *J. Mol. Biol.*, **14**, 288-289, (1965).
- 14 — M.D. MAMET-BRATLEY — Evidence concerning homogeneity of the combining sites of purified antibody, *Immunochemistry*, **3**, 155-162, (1965).
- 15 — R. HAMERS, C. HAMERS-CASTERMAN and S. LAGNAUX — A new allotype in the rabbit linked with as1 which may characterize a new class of IgG, *Immunology*, **10**, N° 5, 399-408, (1966).
- 16 — Y. VALETTE-ROBIN, N. DUPONT-MAIRESSE et R. JEENER — Mise en évidence d'une relation quantitative entre la synthèse des anticorps et celle des  $\gamma$ -globulines non spécifiques impliquée par la théorie de Burnet sur l'origine de la spécificité des anticorps. *Bull. Classe des Sciences, Acad. royale de Belgique*, 5eS, **51**, 1 352 - 1 367, (1965).
- 17 — M. LANCKMAN — Structural heterogeneity of L chains in antibodies of restricted specificity, *Nature*, vol. 210, N° 5 043, 1 379 - 1 380, (1966).
- 18 — C. SZPIRER and R. JEENER — An aspect of antibody heterogeneity suggesting configurational isomerism, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **24**, N° 2, 225-231, (1966).
- 19 — J. URBAIN — Hétérogénéité de site des anticorps et isomères de configuration. *Arch. Internat. Physiol. et Biochim.*, **74**, 5, 29, (1966).
- 20 — M. LANCKMAN — Hétérogénéité des chaînes L dans des anticorps de spécificité restreinte, *Arch. Internat. Physiol. et Biochim.*, **74**, 5, 16, (1966).
- 21 — F. LOOR — Recherches sur la synthèse d'anticorps anti-TMV non précipitables par l'antigène injecté, *Arch. Internat. Physiol. et Biochim.*, **74**, 5, 21, (1966).

## 7 — TITRES ACADEMIQUES ET SCIENTIFIQUES - DEPLACEMENTS

### 7.1 — Thèses de doctorat

N. DUPONT-MAIRESSE — 1962

Sur le caractère anormal des antigènes solubles des phages de *Bacillus megaterium* cultivés en présence de ribonucléase.

G. VANSANTEN — 1964

Effet du bromouracile sur la synthèse et la structure des protéines de phages.

Y. VALETTE-ROBIN — 1966

Recherches sur le mécanisme liant à toute synthèse d'anticorps la synthèse d'une quantité égale d'une  $\gamma$ -globuline non spécifique.

## 7.2 — Voyages d'étude et assistance à des congrès et colloques

- N. DUPONT-MAIRESSE — Laboratoire du Dr. Grabar, Institut Pasteur, Paris et Institut du cancer, Villejuif.
- Y. VALETTE-ROBIN — Laboratoire d'immunochimie (Dr. Burtin), Institut du cancer, Villejuif.
- G. VANSANTEN — Department of Microbiology (Dr. Cebra). The J. Hillis Miller Center, University of Florida, Gainesville.
- C. RENNEBOOG,  
M. LANCKMAN et  
R. HAMERS — Antibody course, Ravello.
- R. HAMERS — Antibody workshop, Rehovoth.
- R. HAMERS — Midwinter immunology conference — San Francisco, 1964.  
— Antibody workshop — Warner Springs, 1964.  
— Congrès IOBAB — Naples, 1964.  
— 50<sup>e</sup> anniv. de la Société de chimie biologique — Paris, 1964.  
— Colloque international sur les mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les micro-organismes — Marseille, 1963.  
— Travail avec A.S. Kelus au sujet des allotypes — Birmingham, 1964.  
— Visite et discussions avec A. FEINSTEIN — Inst. of animal physiology agricultural research Council (Cambridge).
- N. DUPONT-MAIRESSE — Laboratoire d'immunopathologie (Association Claude Bernard) — Paris, 1965.
- F. LOOR,  
J. URBAIN et  
G. VANSANTEN — Summer School Course on Structure and Synthesis of Antibodies, Frascati (Rome)

Laboratoire de Morphogénèse expérimentale et de Physiologie cellulaire  
par J. BRACHET

1 — INTRODUCTION

Les objectifs principaux poursuivis par le laboratoire n'ont pas varié sensiblement au cours des cinq années qui viennent de s'écouler : il s'agissait, essentiellement, d'*analyser le rôle des acides désoxyribonucléiques (DNA), des diverses formes d'acides ribonucléiques (messagers : m-RNA ; ribosomiaux : r-RNA ; de transfert : t-RNA) et des synthèses protéiques dans la morphogénèse et la différenciation cellulaire.* Ces recherches se placent dans le cadre de l'orientation actuelle de l'Embryologie : après avoir été « descriptive » puis « expérimentale », ensuite « clinique », elle est entrée maintenant dans la voie « moléculaire ».

On peut prendre comme hypothèse de travail fondamentale que la différenciation des cellules est étroitement liée à la synthèse de protéines spécifiques. La chose se comprend le mieux dans le cas de cellules qui, tout en prenant un aspect morphologique caractéristique, synthétisent une protéine majeure, de façon presque exclusive : c'est le cas, par exemple, des cellules-mères des globules rouges (réticulocytes) qui ne synthétisent pratiquement que de l'hémoglobine, des cellules qui forment les germes plumaires (synthèse de kératine) ou de celles qui constituent le tissu conjonctif (synthèse de collagène).

Ces diverses protéines (hémoglobine, kératine, collagène) nous sont bien connues grâce aux recherches biochimiques et biophysiques étendues qui ont été effectuées sur elles dans de nombreux laboratoires. Ce qui est beaucoup moins bien connu, c'est le *contrôle de la synthèse* de ces protéines : pourquoi l'hémoglobine n'apparaît-elle que dans une région bien précise (l'îlot sanguin) et à un stade bien défini du développement du jeune têtard ? Pourquoi l'ablation de cet îlot sanguin, à ce stade précoce, rend-elle l'embryon opéré définitivement anémique ? Nous l'ignorons encore complètement ; ce sont les réponses à ces questions qui apporteront, un jour, la solution de l'énigme de la différenciation cellulaire.

Avant de chercher à comprendre le contrôle de la synthèse des protéines spécifiques, il faut connaître le *mécanisme* de cette synthèse. Il n'y a aucune raison, à l'heure actuelle, de supposer qu'il soit profondément différent dans un embryon de ce qu'il est dans une bactérie ou dans une cellule différenciée : la *transcription* du message génétique contenu dans le DNA en m-RNA (DNA → RNA), suivie de sa *traduction* (ou lecture) au niveau des polysomes donnera naissance à des protéines spécifiques (RNA → protéines). On sait que les polysomes sont le site de la synthèse des protéines cytoplasmiques et que ce sont des assemblages de ribosomes, de m-RNA et des t-RNA chargés de leur acide aminé spécifique ; c'est sur une molécule de t-RNA que va croître la chaîne polypeptidique constitutive de la protéine.

Partant de ce schéma désormais classique, il fallait choisir une *hypothèse de travail* simple, qui puisse nous servir de fil conducteur : le noyau des cellules en voie de différenciation produirait, au contact des segments du DNA, des m-RNA spécifiques ; ceux-ci passeraient dans le cytoplasme où ils se combineraient à des ribosomes préexistants pour former des polysomes, où se synthétiseraient les protéines spécifiques (hémoglobine, par exemple) qui donneraient à chaque cellule son cachet particulier. Cette hypothèse rend compte, comme nous le verrons, de

nombreux faits. Elle a le mérite de pouvoir être éprouvée expérimentalement : on pourra, par exemple, bloquer la synthèse des m-RNA en traitant les cellules par l'actinomycine, qui se combine au DNA; à cette voie indirecte, on pourra préférer une attaque plus directe : la détection et l'analyse des m-RNA en les marquant au moyen d'un précurseur radioactif ( $^{32}\text{P}$ , uridine radioactive) et en déterminant ensuite leur combinaison en bases. Il sera possible aussi d'isoler les ribosomes et les polysomes et de les analyser; on pourra encore les suivre au microscope électronique. Quant aux synthèses protéiques, il sera aisé de les mesurer par l'addition aux cellules d'acides aminés radioactifs, ou de les bloquer par l'ajoute d'inhibiteurs spécifiques (puromycine, cycloheximide, etc...). On pourra, enfin, suivre la synthèse d'une protéine spécifique, l'hémoglobine, dans les îlots sanguins des embryons de poulet ou de Batraciens.

C'est dans la voie qui vient d'être esquissée que le laboratoire a déployé le gros de ses efforts au cours des cinq dernières années. Pourtant, le problème du contrôle des synthèses protéiques (dont nous venons de souligner l'extrême importance pour l'analyse de la différenciation cellulaire) n'a pas été oublié, malgré toutes les difficultés qu'il présente. Il nous a semblé qu'il serait fort difficile, dans l'état actuel de nos connaissances, de tenter une vérification expérimentale du schéma de régulation génétique proposé par Monod et Jacob pour les bactéries : en effet, nos connaissances sur la génétique des organismes qui sont favorables aux recherches embryologiques sont encore très rudimentaires; d'autre part, aucun système d'enzyme inductible ou répressible n'a pu être découvert, jusqu'à présent, aux stades jeunes du développement. Il nous a donc paru plus fructueux de suivre les idées de ceux qui, comme Mirsky, Bonner, Frenster, etc., attribuent aux protéines basiques des chromosomes (les histones) le rôle de répresseurs de l'activité génétique : nous avons donc étudié la synthèse des histones, leur localisation, les effets de leur addition à des systèmes biologiques en voie de différenciation.

Il nous a paru important aussi de poursuivre les recherches que le laboratoire effectue, depuis quinze ans, sur le rôle du noyau cellulaire dans la synthèse protéique et la morphogénèse. Nous avons donc comparé ces synthèses dans des fragments nucléés et anucléés d'œufs d'oursin ou de l'algue unicellulaire géante *Acetabularia*. Ces recherches ont conduit à des résultats inattendus : présence de DNA dans le cytoplasme, existence dans ce dernier de m-RNA stables. Des constatations de ce genre expliqueront sans doute le fait que, dans les œufs au début de leur développement, le cytoplasme joue un rôle plus important que le noyau : par exemple, l'ablation d'une mince tranche du cortex de l'œuf fécondé suffit pour empêcher sa gastrulation et, par conséquent, toute morphogénèse. Ces curieuses propriétés du cortex dorsal de l'œuf pourraient être dues à la présence de m-RNA stables ou de DNA cytoplasmique. Ce dernier, quoiqu'il en soit, nous paraît mériter une étude attentive : est-il sous forme uni- ou bicaténaire? Quel est son poids moléculaire? Quelle est sa localisation intracellulaire? Peut-il se répliquer en l'absence du noyau? Est-il radiosensible? Des réponses, qui restent encore fragmentaires, ont pu être apportées à ces questions.

Les matériaux biologiques ont été choisis en fonction des avantages qu'ils présentent pour des études cytochimiques ou biochimiques. Ce sont :

- 1) Les oocytes en voie de croissance ou de maturation. L'oogénèse est, en effet, une période d'activité synthétique intense, indispensable à la suite du développement. Quand ces synthèses prennent fin, la maturation survient : les contenus du noyau et du cytoplasme, qui avaient été longtemps séparés, se mélangent. Cette « révolution » peut, chez les Batraciens, être induite *in vitro* par les hormones hypophysaires. Un tel système permet donc d'étudier les effets d'une hormone sur une seule cellule isolée.
- 2) Les synthèses se bloquent à nouveau pendant la méiose de l'œuf : c'est la fécondation (ou l'activation parthénogénétique) qui mettra en route le développement et les synthèses des macromolécules.

- 3) Le *développement embryonnaire* (oursin, Batraciens, poulet) passe par de nombreuses étapes : on pourra, sur un même matériel, étudier successivement les mitoses pendant la segmentation, les mouvements cellulaires pendant la gastrulation, l'induction et l'organogénèse pendant la neurulation, la différenciation cellulaire aux stades ultérieurs.
- 4) L'algue *Acetabularia* peut être aisément cultivée en laboratoire; sa grande taille et ses capacités élevées de régénération en l'absence du noyau en font un matériel de choix pour l'étude du rôle du noyau cellulaire dans la morphogénèse et les synthèses.
- 5) Enfin, certaines *cellules différenciées* peuvent aussi être étudiées avec profit : les racines d'oignon, les larves de Diptères avec leurs chromosomes géants, les trypanosomes offrent de nombreux avantages pour le cytologiste et le biochimiste.

C'est l'ordre qui vient d'être indiqué qui sera suivi dans le présent rapport. Chacun des matériaux biologiques qui ont été énumérés a été étudié en faisant appel à des techniques aussi variées que possible : cytochimiques, autoradiographiques, biochimiques, biophysiques. La microscopie électronique, à maintes reprises, a permis d'établir le pont indispensable entre la cytologie et la biochimie.

Le présent rapport se limite nécessairement aux recherches qui, ayant été les plus poussées, ont conduit à des conclusions claires; elles ont, le plus souvent, fait l'objet de publications. On trouvera plus de détails dans celles-ci et dans les rapports annuels du laboratoire. En raison de l'existence de ces derniers, l'ordre chronologique n'a pas été suivi dans le présent rapport final. Nous nous sommes efforcé de suivre plutôt l'ordre qui est logique en Biologie moléculaire : commençant par le DNA, on passera aux diverses espèces de RNA et terminera par les protéines. Mais en raison des liens étroits existant entre ces macromolécules, il est, évidemment, impossible de séparer, de façon rigoureuse, la réplication du DNA de sa transcription et celle-ci de la traduction du message génétique.

## 2 — OOGENESE — MATURATION DE L'OOCYTE

2.1 — DNA (E. Baltus, J. Brachet, A. Ficq, M. Geuskens, F. Hanocq, E. Humphries, E. Hubert, Y. Kong, J. Nedvidek, J. Quertier, A. Roller, M. Sempinska, N. Six, G. Steinert, P. Van Gansen)

La présence d'un excédent de DNA dans les œufs de Batraciens était déjà soupçonnée depuis longtemps lorsque le laboratoire a commencé à s'intéresser à la question. Pour la résoudre, une technique fluorométrique, très sensible et maintenant spécifique, a été mise au point pour le dosage du DNA. Nos mesures ont confirmé que les œufs vierges de Batraciens contiennent une réserve importante de DNA; elle serait, en théorie, suffisante pour permettre d'atteindre le stade blastula sans synthèse nette de DNA. Les oocytes contiennent moins de DNA que les œufs qui ont effectué leur maturation (0,05  $\mu\text{g}/\text{oocyte}$  contre 0,07  $\mu\text{g}/\text{œuf}$  vierge, chez le Pleurodèle). Près de 90 % du DNA des œufs vierges se trouve lié à des particules sédimentables par ultracentrifugation (vitellus, grains de pigment, mitochondries et microsomes). (E. Baltus et J. Brachet.)

La question de la localisation précise du DNA dans les homogénats d'oocytes ou d'œufs vierges n'est pas encore complètement tranchée : le gros du DNA, selon E. Baltus et J. Brachet, qui avaient broyé les œufs dans une solution saline, se trouverait associé au vitellus. La présence de DNA dans les grains de pigment a pu être exclue par des expériences de A. Roller. Toutefois, I. Dawid, travaillant dans d'autres laboratoires et effectuant le broyage des œufs dans du saccharose, a conclu que la totalité du DNA cytoplasmique des œufs de Batraciens serait mitochondrial, ce DNA se trouverait sous une forme macromoléculaire et bicaténaire. La question

a été reprise tout récemment, dans notre laboratoire, par J. Nedvidek, qui a confirmé à la fois les observations de Dawid et les nôtres : la distribution du DNA est différente selon la composition du milieu où les œufs sont broyés. Ces expériences devront être reprises afin de clarifier définitivement la question; la réponse la plus probable, à l'heure actuelle, est que les œufs de Batraciens contiendraient *deux* espèces différentes de DNA cytoplasmique : du DNA mitochondrial et un DNA « vitellin », qui se détacherait des plaquettes vitellines quand celles-ci sont traitées par le saccharose. Ce DNA vitellin pourrait n'être qu'un matériel de réserve, de faible poids moléculaire et dépourvu d'importance au point de vue génétique.

Ces conclusions provisoires, tirées d'études biochimiques, sont corroborées par des observations cytochimiques : la réaction de Feulgen (moyen classique de détection du DNA sur coupes histologiques) est négative dans le cytoplasme des œufs de Batraciens. Supposant que ces résultats négatifs pourraient être dus à une labilité excessive du DNA cytoplasmique vis-à-vis de l'hydrolyse acide, celle-ci a été modifiée en substituant à l'hydrolyse classique de Feulgen une hydrolyse avec HCl 1 N dans l'alcool absolu, pendant des temps variables (Brachet et Quertier.) Cette technique a montré la présence, tout à la fin de l'oogénèse, de particules Feulgen positives autour du noyau (vésicule germinative). Il pourrait s'agir de DNA mitochondrial, mais la chose reste à démontrer.

La technique du « Feulgen alcoolique » ne permet, toutefois, pas de déceler du DNA dans le vitellus. Mais une autre méthode, qui a été mise au point au laboratoire, a permis une telle détection : elle consiste à traiter soit les oocytes vivants, soit des coupes pratiquées à travers des ovaires, par de l'*actinomycine marquée* au  $^{14}\text{C}$  ou au tritium  $(^1)$  (Brachet et Ficq). Le vitellus devient, après de tels traitements, fortement radioactif, comme le montre l'autoradiographie. La radioactivité du vitellus est sensible à une digestion par la désoxyribonucléase (DNase), surtout si elle est précédée par un traitement à la ribonucléase (RNase) ou la trypsine. Ces expériences conduisent à la conclusion que le DNA vitellin existe bien, mais qu'il doit être lié aux protéines d'une manière autre que le DNA nucléaire (celui-ci résiste à l'hydrolyse acide selon Feulgen et une digestion à la DNase seule suffit par éliminer toute affinité des noyaux par l'actinomycine radioactive). Ajoutons que le noyau vitellin des jeunes oocytes, qui est riche en mitochondries, ne fixe pas l'actinomycine radioactive avec une intensité particulière, bien qu'il donne une légère réaction de Feulgen. Ces faits sont en bon accord avec l'idée que le DNA des mitochondries et celui des plaquettes vitellines sont entités distinctes.

Dans le noyau des oocytes, on note une fixation d'actinomycine tritiée au niveau du suc nucléaire, en accord avec des données biochimiques, obtenues dans le laboratoire de Mirsky, montrant que le suc nucléaire contiendrait du DNA. Notre technique ne nous a pas permis de déceler du DNA dans les nucléoles; mais ce résultat négatif est probablement dû à une résolution insuffisante des autoradiographies (qui devraient, en principe, être réalisables à l'échelle du microscope électronique) : en effet, des observations encore inédites de E. Baltus et J. Quertier ont montré que les nucléoles isolés à partir d'oocytes d'étoiles de mer contiennent de faibles quantités de DNA. En outre, nous avons constaté tout récemment (J. Brachet, non publié) que l'organisateur nucléolaire (segment des chromosomes qui dirige la synthèse des RNA nucléolaires et ribosomiaux) devient visible, sous la forme d'un granule Feulgen positif adjacent à chaque nucléole, lorsque des ovaires de Batraciens sont traités par de l'actinomycine pendant un temps suffisant (5-6 h) pour provoquer un début de condensation pycnotique des chromosomes.

Des observations de Y. Kong sur la *synthèse* du DNA cytoplasmique pendant l'oogénèse des Batraciens, sont également favorables à l'idée que le DNA périnucléaire (mitochondrial?) et le DNA vitellin constituent deux entités absolument distinctes : en effet, seul le premier se marque par la thymidine- $^3\text{H}$ . C'est aussi dans la région périnucléaire que la lysine radioactive s'incorpore de façon préférentielle : ce fait permet de supposer que le DNA périnucléaire (décelable par la réaction de Feulgen alcoolique) serait associé à des protéines basiques. Par contre, le DNA qui est lié au vitellus se marque après traitement des ovaires par du  $\text{H}^{14}\text{CO}_2\text{H}$ .

$(^1)$  Nos plus vifs remerciements aux Drs. Cifferi (Pavie) et P. Fromageot (Saclay) pour leurs dons généreux d'actinomycine radioactive.

On ne peut pas exclure non plus la possibilité d'une origine exogène d'une partie du DNA cytoplasmique : il a été constaté, de façon répétée, dans notre laboratoire, que du DNA hétérologue (*de E. coli*) ou du phage radioactif pénètre dans les oocytes (principalement dans leur noyau) quand on l'a injecté dans la cavité péritonéale (Y. Kong, E. Sempinska, N. Six). Des expériences visant à établir si, chez l'oursin, le DNA cytoplasmique des œufs (voir plus loin) ne proviendrait pas d'une lyse des cellules folliculeuses sont actuellement en cours.

Passons maintenant au comportement du DNA pendant la *maturation in vitro* (induite par les hormones hypophysaires) des oocytes de Batraciens (J. Brachet, avec la collaboration de E. Hubert et F. Hanocq). Un examen minutieux permet de reconnaître l'apparition, à l'endroit précis où la membrane nucléaire se flétrit, de fins granules Feulgen positifs. Leur origine demeure, pour le moment, énigmatique : le DNA qu'ils renferment pourrait provenir soit du suc nucléaire, soit de petits nucléoles. Cette dernière origine semble la plus probable parce que, quelques heures plus tard, des nucléoles dont la structure demeure typique, bien qu'ils soient en voie de dégénérescence, donnent une nette réaction de Feulgen. Petit à petit, les sphères Feulgen positives deviennent plus volumineuses; elles accompagnent les chromosomes dans leur migration vers le pôle animal. On les retrouve, finalement, dans le cortex de ce pôle. Seules des recherches ultérieures montreront si ce DNA, qui est issu de la vésicule germinative au moment de sa rupture, a une signification biologique profonde; sa localisation finale dans le cortex de l'oocyte ne manque pas de poser des questions intéressantes, en raison de l'importance, déjà soulignée plus haut, du cortex de l'œuf fécondé pour son développement ultérieur. Nous ignorons, d'ailleurs, si l'apparition de ces granules corticaux résulte d'une synthèse nette de DNA : les chiffres rappelés plus haut, qui montrent que l'œuf vierge contient plus de DNA que l'oocyte de premier ordre, permettent de le penser. Toutefois, nous n'avons pas pu déceler jusqu'à présent d'incorporation accrue de thymidine au cours de la maturation de l'oocyte. La question reste donc ouverte.

Nos connaissances actuelles sur la biochimie de la maturation sont encore tellement fragmentaires que nous croyons préférable de présenter, dès maintenant, le peu que nous savons au sujet du RNA et des protéines dans l'oocyte traité par les hormones hypophysaires.

Il est vraisemblable qu'il se produit, au cours de la maturation, une *synthèse de RNA* : selon D. Brown, il s'agirait probablement de m-RNA. Des observations faites dans notre laboratoire par E. Humphries, qui a utilisé la méthode autoradiographique, ont aussi montré que la maturation s'accompagne d'une incorporation accrue d'uridine dans le RNA. Chose curieuse, ce RNA néo-synthétisé s'accumule, comme le DNA dont nous venons de parler, dans le cortex de l'oocyte au moment où sa maturation s'achève. Cette synthèse de RNA semble indispensable pour que la maturation s'achève : des observations, qui doivent encore être poursuivies, montrent, en effet, que l'actinomycine bloque rapidement la maturation des oocytes traités par les hormones hypophysaires (J. Brachet). Un simple examen cytologique suffit, d'ailleurs, pour montrer que le suc nucléaire s'enrichit considérablement en RNA au moment où la membrane nucléaire commence à s'altérer; la microscopie électronique permet de préciser que, à ce moment, le suc nucléaire se remplit de granules ressemblant aux ribosomes (P. Van Gansen). La membrane nucléaire, à ce stade de la maturation, est encore intacte; mais sa morphologie n'est plus tout à fait normale, puisque ses « annuli » ne sont plus reconnaissables. D'autres expériences sont nécessaires avant qu'on puisse décider si le RNA présent dans le suc nucléaire des oocytes en voie de maturation résulte d'une synthèse de nouveaux ribosomes ou d'une migration de ribosomes d'origine cytoplasmique.

Ajoutons qu'une étude parallèle est actuellement en cours sur l'ultrastructure de l'oocyte d'étoile de mer en voie de maturation : les changements observés par G. Steinert ressemblent, à s'y méprendre, à ceux qui ont été décrits par notre collaborateur M. Geuskens dans le cas d'oocytes d'étoiles de mer traités par l'actinomycine (lobulation excessive de la membrane nucléaire, désintégration du nucléole). Chez le Xénope aussi, la dégénérescence des nucléoles au cours de la maturation et après traitement par l'actinomycine présente de curieuses ressemblances (P. Van Gansen).

Il peut sembler paradoxal que l'actinomycine inhibe la maturation, tout en produisant les mêmes changements de l'ultra-structure que celle-ci. En fait, cette similitude d'effets entre l'actinomycine et les hormones hypophysaires dépasse le cadre de l'ultra-structure : comme on l'a signalé plus haut, dans les deux cas, les nucléoles se chargent de DNA, tout en perdant une partie de leur RNA; dans les deux cas, les chromosomes se condensent et subissent un début de pycnose. On peut en déduire, à titre d'hypothèse, que les hormones hypophysaires — comme l'actinomycine — réprimerait l'activité de certains segments du DNA, celle des organisateurs nucléolaires en particulier. Une telle hypothèse cadrerait bien avec le fait que la synthèse des r-RNA (qui prédomine pendant l'oogénèse, comme nous allons le voir) cesse après la maturation pour ne reprendre qu'à la gastrulation. Mais les effets des hormones hypophysaires et ceux de l'actinomycine sont probablement différents au niveau d'autres segments du DNA : il semble bien, quoique l'actinomycine bloque la maturation, que des synthèses de RNA spécifiques soient requises pour qu'elle puisse se produire. C'est sous l'influence des hormones hypophysaires que certains segments du DNA seraient déreprimés et que les messagers correspondants seraient synthétisés; peut-être ces messagers dirigent-ils la synthèse des enzymes (protéases, RNase) qui sont nécessaires pour la destruction de la membrane nucléaire et des nucléoles. Ce ne sont là que des hypothèses; mais cette discussion montre que la maturation induite *in vitro* sous l'influence des hormones hypophysaires, pose de très intéressantes questions sur les mécanismes de la régulation de l'activité génétique.

Notre ignorance, en ce qui concerne les *synthèses des protéines* au cours de la maturation, est quasi totale : tout ce que nous savons, c'est que l'incorporation de la leucine dans les protéines est importante au moment où la membrane de la vésicule germinative se rompt (F. Hanocq). Toutefois, nous ne sommes pas parvenus, jusqu'à présent, à arrêter la maturation en traitant les oocytes par la puromycine (J. Brachet et E. Hubert). Mais cet inhibiteur pénètre mal dans les œufs de Batraciens; ces expériences seront donc reprises en micro-injectant la puromycine dans les oocytes en voie de maturation et en les traitant par d'autres inhibiteurs des synthèses protéiques (la cycloheximide, notamment).

## 2.2 — RNA (M. Cape, M. Decroly, A. Ficq, M. Geuskens, F. Levy, C. Thomas)

### 2.2.1 RNA du nucléole et du suc nucléaire

On sait que c'est à A. Ficq qu'on doit les premières autoradiographies démontrant que c'est dans le nucléole que les précurseurs du RNA s'incorporent en premier lieu. Ces expériences désormais classiques avaient été effectuées sur des oocytes d'étoiles de mer et c'est sur ce même matériel qu'elles ont surtout été poursuivies. Les oocytes d'oursin et de Batraciens ont été étudiés aussi.

L'un des problèmes examinés par A. Ficq a été de suivre les effets de l'*actinomycine* et de la *puromycine* sur la synthèse des RNA dans les oocytes; les précurseurs radioactifs choisis étaient l'uridine et la cytidine. Les expériences ont montré clairement que l'actinomycine inhibe, en premier lieu, la synthèse du RNA *nucléolaire*; ce n'est que plus tardivement qu'elle agit sur la synthèse du RNA présent dans le suc nucléaire (où baignent les chromosomes). Il faut en conclure que l'actinomycine doit se combiner plus aisément avec le DNA de l'organisateur nucléolaire qu'avec celui des autres segments des chromosomes et qu'elle bloque la synthèse des RNA nucléolaires de haut poids moléculaire (qui sont les précurseurs des r-RNA) avant celle des m-RNA. Des résultats semblables ont été obtenus depuis sur de très nombreux autres systèmes biologiques. Leur raison est encore inexplicée (teneur plus élevée en G C de l'organisateur nucléolaire, ou combinaisons différentes du DNA, en divers lieux des chromosomes, avec des protéines?). Quant à la puromycine, elle a exercé les effets prévus : pas d'inhibition appréciable de la synthèse des RNA dans les conditions où celle des protéines est presque abolie.

M. Geuekens a également étudié l'incorporation de l'uridine et de la cytidine dans les oocytes d'étoiles de mer, mais en recourant à la méthode des « pulses » (report des œufs marqués dans de l'eau de mer normale). Ces expériences ont montré que, contrairement aux prévisions, on n'observe pas de démarquage du nucléole; au contraire, sa radioactivité continue à s'élever même après le report dans de l'eau de mer.

Plus récemment, A. Ficq a étudié le sort du RNA synthétisé dans le noyau de l'oocyte au cours de sa maturation. Dans les oocytes qui ont été marqués peu avant la maturation, celle-ci provoque la dispersion du RNA d'origine nucléaire dans tout le cytoplasme. Même quand on centrifuge ces oocytes, la distribution des RNA marqués demeure homogène, ubiquitaire. Ces observations cadrent bien avec des données biochimiques de Maggio et Monroy, qui indiquent que les m-RNA synthétisés par le noyau de l'oocyte se retrouveraient, après la maturation, associés aux ribosomes des œufs vierges.

### 2.2.2 *r-RNA*

La synthèse des RNA, au cours de l'oogénèse, a été étudiée par F. Levy, M. Decroly et M. Cape. On aurait pu s'attendre, du fait que de nombreuses protéines se synthétisent pendant la croissance de l'oocyte, à observer une synthèse préférentielle de m-RNA. En réalité, les expériences de marquage au  $^{32}\text{P}$  ont montré que les synthèses de RNA, dans l'oocyte en voie de croissance, sont relativement lentes; il s'agit de RNA riches en guanine (34 %), qui présentent toutes les caractéristiques des r-RNA. L'oocyte, au cours de sa croissance, synthétise donc principalement un stock de ribosomes qui pourra suffire aux synthèses protéiques jusqu'à un stade avancé du développement (le mutant « anucleolate » de xénope qui, selon Brown et Gurdon, ne synthétise pas de r-RNA peut survivre jusqu'après l'éclosion du têtard). Des résultats entièrement semblables aux nôtres ont été obtenus, au même moment, par Davidson (dans le laboratoire de Mirsky).

Les ribosomes de l'oocyte de xénope en voie de croissance font l'objet d'une étude approfondie au microscope électronique (C. Thomas). Les très jeunes oocytes, bien qu'ils soient basophiles, n'ont pas ou peu de ribosomes: le RNA cytoplasmique se présente surtout sous la forme de travées fibrillaires. Dans les oocytes de taille moyenne, qui sont en pleine vitellogénèse, les ribosomes sont nombreux et d'aspect normal. Dans les oocytes les plus volumineux, où la formation du vitellus s'est arrêtée, la taille des ribosomes augmente et leur structure devient plus homogène. Ce changement dans la taille des ribosomes pourrait peut-être expliquer l'arrêt des synthèses protéiques en fin d'oogénèse: il serait concevable que les « gros » ribosomes se combinent mal au m-RNA et qu'ils ne puissent pas, de ce fait, former des polysomes fonctionnels. Mais, avant de conclure, de nombreux contrôles restent nécessaires: reprise des observations avec le nouveau microscope électronique A E I, à haute résolution, dont dispose maintenant le laboratoire; vérification soigneuse de la nature ribosomiale des structures observées, des confusions restant possibles en raison de l'abondance du glycogène dans les œufs de Batraciens; isolement des ribosomes aux diverses étapes de l'oogénèse et mesure de leur constante de sédimentation, etc.

### 2.2.3 *Méthylation des t-RNA*

Le rôle des bases méthylées, dans les t-RNA, n'est pas encore élucidé; il est probable qu'elles interviennent lors de la lecture du message génétique et concourent à assurer la fidélité de sa traduction.

A. Ficq a abordé le problème du site de la méthylation des t-RNA, au cours de l'oogénèse des Echinodermes et des Batraciens, par la méthode autoradiographique; les précurseurs choisis ont été la 5-méthylcytosine dans une première série d'expériences, la méthionine (marquée sur le  $\text{CH}_3$ ) dans une seconde. Les expériences ont montré que la cinétique de l'incorporation de la 5-méthylcytosine est très différente de celle qui a été rappelée plus haut pour la cytosine (incorporation préférentielle dans le nucléole): en effet, la 5-méthylcytosine s'incorpore à la fois dans

les RNA du noyau et ceux du cytoplasme. Quant aux expériences effectuées au moyen de méthionine marquée sur le groupe méthyle, elles ont montré que la méthylation des t-RNA est plus intense dans le noyau (notamment au niveau des chromosomes plumeux) que dans le cytoplasme. Le marquage n'est guère influencé par des inhibiteurs des synthèses protéiques tels que la fluorophénylalanine ou l'éthionine mais il est fortement inhibé par la puromycine. Ce fait rend plus délicate l'interprétation des résultats, puisque la méthionine s'incorpore évidemment aussi dans les protéines. Il est à noter toutefois que, alors que la fécondation, chez l'œuf d'oursin, stimule fortement l'incorporation de la méthionine dans les protéines, elle n'augmente nullement la méthylation des t-RNA. Sans qu'on puisse fournir une explication simple des résultats, qui font penser que la méthylation des t-RNA pourrait se faire partiellement dans le cytoplasme, on peut conclure que, contrairement à l'opinion émise récemment par Sirlin, la synthèse et la méthylation des t-RNA n'est pas une fonction spécifique des nucléoles.

#### 2.2.4 Contrôle de la synthèse des RNA

A. Ficq a entrepris récemment une étude des effets exercés par les histones (homologues et hétérologues) sur la synthèse des RNA dans les oocytes d'étoiles de mer. Dans ce but, des histones ont été préparées à partir des ovaires et des testicules, puis séparées par électrophorèse et analysées; les histones isolées à partir des gonades mâles et femelles se sont montrées remarquablement semblables. Quant à la synthèse des RNA, elle a été suivie par autoradiographie après incorporation de précurseurs marqués. Les expériences ont montré que les histones hétérologues (de thymus de veau) n'exercent pas d'effets; par contre, on observe de façon paradoxale, une *stimulation* de la synthèse du RNA après traitement des oocytes par les histones homologues ou par la polylysine. Ce travail se poursuit en suivant la pénétration et la localisation intracellulaire d'histones radioactives; il importera de rechercher si les histones et la polylysine ne modifient pas la perméabilité de la membrane des oocytes, permettant ainsi une pénétration accélérée des précurseurs.

Des observations cytochimiques encore en cours ont montré à A. Ficq que le suc nucléaire contient du RNA, mais que celui-ci est masqué par des protéines basiques. Ces expériences ont consisté à colorer le RNA et les protéines (au bleu de bromophénol) avant et après l'extraction des protéines basiques par HCl ou la trypsine. Un tel traitement augmente fortement la basophilie du suc nucléaire, qui doit donc être plus riche en RNA qu'on ne le pensait. Il sera intéressant de déterminer la composition en bases de ce RNA, afin de préciser s'il ressemble plutôt au DNA qu'au r-RNA et d'analyser la protéine qui lui est associée. Cette protéine pourrait, en effet, jouer un rôle important dans la régulation de l'activité génétique.

### 2.3 — Protéines (M. Geuskens, A.M. Preumont)

On doit à M. Geuskens une étude de la synthèse des protéines, dans les oocytes d'étoiles de mer, au cours de l'année : on y observe un comportement cyclique tant en ce qui concerne la teneur en RNA que la synthèse des protéines basiques. Par exemple, l'incorporation d'arginine dans les protéines se produit uniquement pendant deux périodes de l'année (janvier-février et avril-mai). Alors que la synthèse des protéines basiques présente ce comportement cyclique, celle des protéines totales est continue. Il se pourrait que ces protéines basiques interviennent dans la régulation de la synthèse des RNA et, par voie de conséquence, des protéines.

Signalons, enfin, que des nucléoles d'oocytes d'étoiles de mer ont été isolés et que leur composition en *acides aminés* a été analysée (A.M. Preumont).

### 3 — FECONDATION ET PARTHENOGENESE

La plupart des expériences qui vont être relatées ont été effectuées au Laboratoire international de Génétique et de Biophysique (L.I.G.B.) à Naples, avec lequel une collaboration étroite et fructueuse s'est établie. Le problème qui a été principalement étudié est celui du déclenchement explosif des synthèses de protéines lors de la fécondation ou de l'activation parthénogénétique des œufs d'oursin : ces synthèses, comme l'a montré Monroy, sont très faibles dans les œufs vierges, mais l'incorporation des acides aminés dans les protéines devient très importante immédiatement après la fécondation. Les recherches qui vont être résumées ci-dessous ont conduit aux principales conclusions suivantes : la stimulation des synthèses protéiques ne peut pas être due à la synthèse d'un nouveau m-RNA par le noyau, parce qu'elle se produit même dans des fragments *anucléés* activés; elle est probablement contrôlée par des m-RNA à vie longue, issus de la vésicule germinative des oocytes en voie de maturation (on a vu plus haut que ces RNA ont une distribution ubiquitaire dans les œufs vierges); on ne peut exclure totalement la possibilité que des m-RNA soient synthétisés sur du DNA cytoplasmique.

#### 3.1 — DNA (E. Baltus, T. Bibring, J. Brachet, J. Quertier, partiellement en collaboration avec F. Gaeta et F. Graziosi, du L.I.G.B.)

Les œufs d'oursin, comme ceux des Batraciens, contiennent un excédent de DNA; il est, toutefois, proportionnellement, moins important et il ne correspond qu'à la teneur en DNA de 50 à 100 noyaux diploïdes.

Il était important d'établir, pour conclure, si ce DNA est réellement localisé dans le cytoplasme. Dans ce but, une méthode de centrifugation permettant d'obtenir en abondance des fragments nucléés et anucléés d'œufs vierges a été mise au point. La teneur en DNA des deux types de fragments a été déterminée par fluorométrie; il a été constaté qu'elle est sensiblement égale. Puisque les fragments anucléés contiennent environ 50 % du DNA total, la preuve de l'existence d'un DNA cytoplasmique, dans l'œuf d'oursin, était faite (E. Baltus, T. Bibring, J. Brachet, et F. Quertier).

L'étape suivante a été de caractériser ce DNA cytoplasmique : dans ce but, il a été isolé soit à partir d'œufs vierges, soit à partir de fragments nucléés ou anucléés. A titre de comparaison, du DNA nucléaire a été isolé à partir des spermatozoïdes de la même espèce d'oursin (*Arbacia*). La densité en gradient de CsCl de ces diverses préparations de DNA a été mesurée, avec l'aide des Prof. F. Graziosi et F. Gaeta : elle est identique pour tous les échantillons, ce qui signifie que le DNA cytoplasmique et le DNA nucléaire ont la même composition globale en bases (même rapport  $G + C/A + T$ ). Ajoutons que le DNA cytoplasmique des œufs d'oursin se trouve sous forme macromoléculaire (P.M. d'au moins  $1.10^6$ ) et que, comme on l'a montré dans un autre laboratoire, il possède une forme en double hélice.

Nous ignorons, malheureusement, encore tout de son origine, de sa localisation intracellulaire, de son rôle possible. Tout ce qu'on peut ajouter à son sujet, c'est que les fragments anucléés sont le siège d'une faible incorporation de thymidine, dans des conditions où on peut exclure tout risque de contamination bactérienne. Cette observation est compatible avec l'hypothèse d'une localisation mitochondriale du DNA cytoplasmique chez les œufs d'oursin, mais la chose reste à démontrer. Si cette interprétation était exacte, on pourrait en déduire le fait intéressant que les mitochondries seraient capables de réplication en l'absence du noyau.

#### 3.2 — RNA et synthèse des protéines (E. Baltus, J. Brachet, A. Burny, M. Cape, M. Decroly, A. Ficq, J. Quertier, R. Tencer)

Nous avons déjà signalé plus haut que l'hypothèse d'une synthèse rapide de m-RNA à la fécondation de l'œuf d'oursin (qui avait été proposée notamment par Nemer et par Hultin) ne

peut être retenue. En voici les raisons : tout d'abord, nous ne sommes pas parvenus à déceler une synthèse rapide et importante de RNA en ajoutant aux œufs fécondés des précurseurs tels que le  $^{32}\text{P}$  ou l'uridine- $^3\text{H}$  : c'est seulement quand la segmentation débute (stade 2-4 blastomères) que l'autoradiographie permet de déceler une incorporation d'uridine dans le RNA des noyaux (J. Brachet, M. Decroly, A. Ficq et J. Quertier). Mais il existe un argument autrement décisif : c'est qu'il suffit d'activer parthénogénétiquement (avec de l'eau de mer hypertonique) des fragments anucléés pour y induire immédiatement une intense synthèse de protéines : ce fait, qui a été confirmé dans d'autres laboratoires, a été établi d'abord par autoradiographie, ensuite par voie biochimique (E. Baltus, J. Brachet, A. Ficq, J. Quertier et R. Tencer).

En fait, l'incorporation des acides aminés est même plus importante, quantitativement, dans les fragments anucléés que dans les nucléés. Dans les deux cas, c'est l'activation parthénogénétique (ou la fécondation) qui stimule les synthèses protéiques. Qu'il s'agisse d'une authentique synthèse de protéines est rendu très probable du fait que différents acides aminés sont incorporés dans la même proportion relative, qu'il s'agisse d'œufs normalement fécondés ou de fragments anucléés activés. En outre, la puromycine inhibe l'incorporation des acides aminés dans ces derniers. Ces recherches sont actuellement poursuivies et nous nous efforçons d'isoler, en ce moment, la protéine (ou les protéines) synthétisée par les fragments anucléés activés et par les œufs fécondés.

En ce qui concerne le RNA des fragments anucléés, il constitue environ 40 % du total. Ce RNA n'est pas absolument stable car on note une incorporation faible, mais continue, d'uridine ou de cytidine dans les fragments anucléés. Cette incorporation, à l'inverse de celle des acides aminés, n'est pas stimulée par l'activation parthénogénétique; elle répond de manière variable (parfois même par une stimulation) à l'addition de séquences terminales (CCA) aux t-RNA, mais la chose reste à établir. (E. Baltus, J. Brachet, A. Ficq et J. Quertier).

Si les fragments anucléés sont capables d'une véritable synthèse de protéines, sensible à la puromycine, ils doivent contenir des polysomes engagés dans cette synthèse. Il en est bien ainsi, mais ils sont peu nombreux et ne peuvent être mis en évidence que par une méthode indirecte (bref marquage des fragments par des acides aminés radioactifs, homogénéisation, centrifugation en gradient de saccharose, démonstration du passage de la radioactivité dans le pic des monosomes après traitement par le RNase). (J. Brachet, A. Burny, G. Marbaix et J. Quertier). Ces polysomes proviennent, sans doute, de la combinaison des ribosomes (monosomes) avec des m-RNA stables, préexistants dans les œufs vierges; cette combinaison se ferait à la suite de l'activation parthénogénétique, qui «débloquerait» les monosomes des œufs vierges (ceux-ci, selon les travaux de Monroy, ne peuvent se combiner avec des m-RNA que si on leur fait subir un court prétraitement par la trypsine). L'origine de ces m-RNA stables reste encore obscure : s'il est probable qu'ils proviennent, comme nous l'avons déjà dit, de la vésicule germinative de l'oocyte, on ne peut exclure entièrement l'hypothèse d'une synthèse dirigée par le DNA cytoplasmique.

### **3.3 — Production d'énergie et synthèse des protéines lors de la fécondation de l'œuf d'oursin** (J. Brachet, S. Denis, T. Devlin, M. Geuskens, J. Quertier, R. Tencer et S. Van Assel).

Il est possible que les raisons pour lesquelles les synthèses de protéines sont réprimées, dans l'œuf d'oursin, soient multiples. L'une d'entre elles pourrait être que la production d'énergie, dans ces œufs qui ne consomment presque pas d'oxygène, pourrait être insuffisante pour que des synthèses quelconques soient possibles. Certes, la teneur en ATP des œufs vierges et fécondés sont du même ordre de grandeur; mais il ne manque pas de théories soutenant que la source d'énergie pour les synthèses ne serait pas l'ATP lui-même, mais un intermédiaire phosphorylé riche en énergie de la chaîne de transfert d'électrons. D'autre part, on a montré récemment (Ecker)

que la fécondation de l'œuf d'oursin est suivie, de façon quasi instantanée par une phosphorylation du D (NAD) en TNP (NADP). Or ce dernier co-enzyme, sous sa forme réduite (TPNH), joue un rôle important dans de nombreuses synthèses. Il se produit donc, au moment de la fécondation de l'œuf, une activation (ou une synthèse) de la NADkinase et il serait intéressant de savoir si elle a lieu aussi dans le cas de fragments anucléés activés parthénogénétiquement.

Des observations, déjà anciennes, de Shapiro et de Ballentine rendaient plus nécessaire encore une étude comparative de la production d'énergie dans les deux types de fragments : ils ont montré, en effet, que la consommation d'oxygène et l'activité des déshydrogénases sont plus élevées dans les fragments anucléés que dans les autres. Ce fait pourrait expliquer que, dans nos propres expériences, les synthèses protéiques se soient avérées être plus fortes dans les fragments anucléés que dans les moitiés nucléées.

Nos observations dans ce domaine, sont encore trop fragmentaires pour qu'on puisse tirer des conclusions. Quelques faits intéressants ont, cependant, pu être établis. Tout d'abord, l'ultrastructure des fragments nucléés et anucléés a été étudiée, au microscope électronique, par M. Geuskens : il a pu montrer que les mitochondries présentes dans les deux types de fragments sont très différentes en ce qui concerne leur densité aux électrons et le développement de leurs « cristae ». La centrifugation des œufs vierges en milieu isopycnotique sépare donc deux populations distinctes de mitochondries; ces observations faites au microscope électronique permettent de mieux comprendre les résultats anciens de Shapiro et de Ballentine.

D'autre part, une étude soignée de la respiration des œufs d'oursin, par une méthode polarographique sensible et rapide, a montré que la stimulation de la respiration, lors de la fécondation, peut se décomposer en trois phases : une période de latence (2 mn), une phase de stimulation rapide (3-5 mn) et une phase où l'activité respiratoire est constante et plus basse (20-30 mn). L'addition de polylysine, qui affecte la membrane ovulaire, fait disparaître la phase initiale de latence : celle-ci correspondrait au temps nécessaire pour que le spermatozoïde exerce ses effets à l'intérieur même de l'œuf (T. Devlin). Ajoutons que nous avons pu confirmer l'existence d'une synthèse rapide de TNP lors de la fécondation et qu'une expérience préliminaire a montré qu'elle se produit aussi lorsqu'on féconde des fragments anucléés (S. Denis).

Le dinitrophénol augmente la consommation d'oxygène des œufs vierges et fécondés : ces expériences de T. Devlin indiquent que la faible respiration des œufs vierges est plus probablement due à un manque de substances qu'à la présence d'inhibiteurs des enzymes respiratoires; c'est cette explication qui était généralement donnée, jusqu'à maintenant, pour la faible consommation d'oxygène des œufs d'oursins.

Enfin, les effets de deux inhibiteurs de la production d'énergie sur le développement et la synthèse des protéines ont été étudiés, toujours chez l'œuf d'oursin, par J. Brachet, J. Quartier et R. Tencer. Ce sont le *dinitrophénol* qui augmente la consommation d'oxygène et diminue la teneur en ATP, et l'*oligomycine* qui empêche la respiration et la phosphorylation de l'ADP. Tous deux inhibent rapidement la segmentation de l'œuf; loin d'avoir un effet additif, ils tendent plutôt à se neutraliser l'un l'autre.

Quant à l'incorporation des acides aminés dans les protéines, l'oligomycine inhibe fortement celle de la leucine-<sup>14</sup>C. Chose curieuse, les fragments anucléés sont beaucoup plus sensibles à l'oligomycine que les nucléés, en ce qui concerne la synthèse des protéines. Ce fait est probablement à rapprocher des observations de M. Geuskens (cf. plus haut) montrant que les deux types de fragments possèdent des populations différentes de mitochondries.

### 3.4 — Formation de cytasters (J. Brachet et S. Van Assel)

On sait qu'un traitement par l'eau lourde (D<sub>2</sub>O) entraîne dans l'œuf vierge d'oursin l'apparition de nombreux cytasters, puis la parthénogénèse. Nous avons effectué des expériences similaires sur des œufs de Batraciens : l'eau lourde (50-100 %) y provoque un arrêt rapide des

mitoses dans les œufs fécondés et l'apparition de centaines de cytasters dans les œufs vierges. Ces cytasters se forment dans l'hyaloplasme et ils apparaissent simultanément. Il ne semble pas qu'ils soient capables de se diviser. Au microscope électronique, on constate que les cytasters sont formés de micro-tubules plus grossiers que ceux qui constituent les fibres extérieures typiques. A plusieurs reprises, des centrosomes (centrioles), dont la structure manquait de netteté, ont été observés au centre des cytasters. La formation de ces derniers n'est pas inhibée par la micro-injection d'actinomycine ou de puromycine (nous verrons que cette dernière bloque rapidement les mitoses dans les œufs de Batraciens en voie de segmentation). Ces observations sont, dans l'ensemble, compatibles avec l'idée que les centrosomes des œufs résulteraient de l'assemblage de protéines préformées dans le cytoplasme plutôt que d'une réplication de centrosomes pré-existants.

### 3.5 — Ultrastructure des œufs vierges et fécondés de Xénope (P. Van Gansen)

Elle est étudiée très soigneusement au microscope électronique, en particulier au niveau du cortex (pôle animal, pôle végétatif, croissant gris). On y observe des plages riches en polyribosomes qui, au cours de la réaction corticale, se rassemblent au pôle végétatif. Dans les autres territoires, on ne voit que des granules, isolés ou en chaînettes, dispersés de façon homogène dans le cytoplasme. Cette localisation élective des polysomes au pôle végétatif tient sans doute à ce que la réaction corticale, après la fécondation, progresse en allant du pôle animal au pôle végétatif. On ne peut exclure, toutefois, la possibilité que les polysomes présents au pôle végétatif aient quelque chose à voir avec le « déterminant génital » (ce territoire, qui est nécessaire à la formation des gonades, est situé au pôle végétatif chez le Xénope et sa destruction par les U.V. entraîne la stérilité). Il serait intéressant de s'en assurer, notamment en étudiant les effets des U.V. sur l'ultrastructure du cortex du pôle végétatif.

## 4 — DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

### 4.1 — Considérations théoriques (J. Brachet)

Nous avons présenté, à plusieurs reprises, quelques hypothèses sur les bases moléculaires de la morphogénèse chez les Batraciens. En voici l'essentiel : l'œuf vierge se caractériserait par un *gradient de polarité* dans la distribution des ribosomes; ce gradient décroîtrait du pôle animal au pôle végétatif; il se constituerait pendant l'oogénèse, probablement sous contrôle génétique. Peu après la fécondation, au moment où l'œuf effectue sa rotation sous l'influence de la pesanteur, il s'établirait des différences entre le côté ventral (rendues parfois visibles par l'apparition du « croissant gris »). Pendant la segmentation, la réplication du DNA l'emporterait de beaucoup sur sa transcription; les mitoses exigeraient, cependant, des synthèses de protéines pour se produire; mais ces synthèses seraient dirigées par des m-RNA préexistants et stables, semblables à ceux qui ont été discutés plus haut à propos des œufs d'oursin. C'est seulement à la gastrulation que débiterait la dérégulation de l'activité génétique. Cette dérégulation, qui conduirait à une synthèse de m-RNA, débiterait du côté dorsal (donc, dans la lèvre dorsale du blastopore, c'est-à-dire dans « l'organisateur »); elle serait contrôlée ou provoquée par les substances (de nature inconnue) qui se seraient accumulées dans le croissant gris peu après la fécondation. Les m-RNA synthétisés par les noyaux se combinant aux ribosomes préexistants, il en résulterait un double gradient (animal-végétatif et dorso-ventral) dans la distribution des polysomes; par conséquent, la synthèse des protéines spécifiques se ferait selon ce double gradient qui correspond aux gradients morphogénétiques des embryologistes expérimentateurs (gradients céphalocaudal et dorsoventral).

Ce schéma, qui vient d'être résumé à l'extrême, est basé en partie sur des observations déjà anciennes du laboratoire (existence d'un gradient animal-végétatif de polarité dans la distribution du RNA; synthèse de RNA nucléaire débutant dans la lèvre dorsale du blastopore). Mais ce sont surtout les expériences effectuées au cours des cinq dernières années qui ont permis de le développer et de montrer qu'il rend compte de nombreux faits. Ces expériences, comme il a été dit dans l'introduction de ce rapport, ont été soit indirectes (effets d'inhibiteurs), soit directes (mesure de la synthèse des macromolécules).

## 4.2 — DNA

### 4.2.1 Synthèses — Effets d'inhibiteurs (H. Alexandre, E. Baltus, N. Bieliavsky, J. Brachet, M. Geuskens, E. Hubert, M. Lamborot, G. Leong, J. Quertier, E. Sempinska et R. Tencer)

Lorsqu'on dose la teneur en DNA des œufs de Batraciens au cours du développement, on n'observe qu'une très faible synthèse pendant la segmentation : c'est la présence de l'excédent de DNA cytoplasmique qui fausse évidemment les dosages à ces stades où les noyaux sont très peu nombreux. Leur synthèse nette de DNA devient aisément mesurable pendant la gastrulation; son rythme s'accélère considérablement pendant la neurulation et le développement ultérieur (E. Baltus et J. Brachet).

Une question qui se pose immédiatement est la suivante : le DNA cytoplasmique est-il utilisé tel quel pour la réplication des chromosomes? Nous pensons qu'il faut donner une réponse négative à cette question, tout au moins dans l'état actuel de nos connaissances. Une étude de la fixation d'actinomycine radioactive (cf. plus haut) dans les œufs de Batraciens en voie de développement est actuellement en cours (J. Quertier et J. Brachet); l'examen des autoradiographies est suffisamment avancé pour pouvoir conclure que le DNA cytoplasmique décelable par cette méthode ne disparaît que lentement du vitellus. En fait, la diminution de la radio-activité dans le cytoplasme semble suivre très exactement la résorption des plaquettes vitellines dans leur entièreté. Ces observations permettent de penser que le DNA « vitellin » n'est rien d'autre qu'un matériel de réserve, comme les autres constituants des plaquettes vitellines : il se libère, vraisemblablement, quand celles-ci se résorbent et il pourrait servir, après dégradation, à maintenir à un niveau suffisant le « pool » des précurseurs requis pour la synthèse du DNA chromosomal. Il est, en tout cas, certain que la réplication de ce DNA chromosomal peut se faire aux dépens de *précurseurs simples* (nucléosides) dès le début de la segmentation : à ce stade, on observe une forte incorporation de la thymidine ou de l'uridine dans le DNA nucléaire (N. Bieliavsky et R. Tencer). Le fait que l'uridine, surtout aux stades jeunes (segmentation), constitue un excellent précurseur du DNA montre que l'œuf doit posséder les enzymes requis pour la réduction du ribose en d-ribose.

Nos connaissances sur les enzymes intervenant dans le métabolisme intermédiaire du DNA sont encore extrêmement rudimentaires dans le cas des œufs de Batraciens. Par contre, de nombreuses expériences indirectes où des *nucléosides* (normaux ou anormaux) ont été ajoutés aux œufs, ont été effectuées dans notre laboratoire par N. Bieliavsky, G. Leong et R. Tencer. Ces nucléosides ont été administrés soit à des cellules de blastulas dissociées au citrate, soit à des œufs tout au début de leur segmentation (par micro-injection). Voici les principaux résultats de ces expériences, qui ont été analysées par autoradiographie : les ribonucléosides sont sans effets, sauf l'adénosine qui est inhibitrice; par contre, les d-ribonucléosides sont inhibiteurs, à l'exception de la d-cytidine qui exerce des effets favorables.

Les fluorodérivés de l'uracile (FU, FUR, FUDR) arrêtent le développement et inhibent la synthèse de protéines. C'est la FUDR (inhibiteur de la thymidylatekinase) qui a été la mieux étudiée : après injection, le développement se bloque au stade jeune blastula; l'addition de thymidine à ces œufs exerce un effet favorable, puisque le développement atteint le stade de la blastula

avancée. La FUDR inhibe la synthèse du DNA et, partiellement, celle du RNA. L'analyse des résultats, sur le plan biochimique, a conduit N. Bieliavsky et G. Leong à la conclusion suivante : la transformation de la d-uridine en thymidine ne se produit pas pendant la segmentation.

D'autres inhibiteurs de la synthèse du DNA ont été étudiés au laboratoire : la mitomycine par N. Bieliavsky; le phényléthylalcool (PEA), la DNase (en micro-injection) et l'hydroxyurée par J. Brachet et E. Hubert. La *mitomycine* bloque rapidement la segmentation, en produisant des altérations chromosomiales; après une stimulation initiale, la synthèse de DNA s'arrête progressivement. Si le PEA, en principe, est un inhibiteur spécifique des synthèses de DNA chez les bactéries, il n'en va pas de même dans le cas des œufs de Batraciens : le développement ne s'arrête que tardivement (neurulation) et, dans les embryons bloqués, les mitoses sont nombreuses et normales; par contre, les noyaux au repos sont anormalement pauvres en RNA. La micro-injection de *DNase* acide n'a pas encore conduit à des résultats suffisamment bien analysés pour qu'on puisse en tirer des conclusions : aux concentrations fortes (15  $\mu\text{g/ml}$ ), le développement se bloque très rapidement (en morula ou blastula) et les chromosomes présentent des anomalies (fragmentation, suivie de duplication répétée). Aux concentrations plus faibles (3-5  $\mu\text{g}$ ), on peut obtenir des têtards, qui sont généralement anormaux. Ces expériences mériteraient d'être reprises en suivant le sort du DNA cytoplasmique par notre technique à l'actinomycine radioactive. L'*hydroxyurée*, enfin, s'annonce comme étant un inhibiteur utile et efficace : elle bloque le développement dès le stade 4-8 blastomères, chez l'oursin, et au stade blastula chez les Batraciens. Dans les deux cas, la chromatine est profondément altérée et les noyaux en interphase contiennent de nombreuses sphérules qui ressemblent à des nucléoles; mais elles s'en distinguent par le fait qu'elles ne possèdent pas de RNA et que leur ultrastructure ne ressemble en rien à celle des nucléoles typiques. A faibles concentrations (10  $\mu\text{g/ml}$ ), l'effet de l'hydroxyurée peut être partiellement renversé par l'addition de thymidine. Il semble (des expériences encore en cours devraient permettre prochainement d'être plus catégorique) que l'hydroxyurée, à forte concentration, modifie le DNA de telle sorte qu'il devient impropre tant à sa réplication qu'à sa transcription (le blocage se produit, tant chez l'oursin que chez les Batraciens, au stade précis où la synthèse de RNA débute dans les noyaux); à faible concentration, elle pourrait agir en inhibant la réduction du ribose en d-ribose. Notons encore un fait curieux à propos de cet inhibiteur : le cortex des œufs d'oursin ou de Batraciens traités par l'actinomycine devient Feulgen positif et son ultrastructure se modifie (J. Brachet et M. Geuskens). Ce fait pourrait avoir son intérêt quand on se souvient de l'importance que les embryologistes attachent au cortex comme facteur de la morphogénèse.

Un autre type d'expérience a été effectué par E. Sempinska : la micro-injection de *DNA* *homologue* ou *hétérologue* (thymus de veau, *E. coli*) dans les œufs de Pleurodèles. Les *DNA* hétérologues exercent un effet inhibiteur beaucoup plus marqué sur le développement que le *DNA* homologue : injectés au stade 2-4 blastomères, ils provoquent le ralentissement, puis l'arrêt du clivage. Si on les injecte dans le blastocèle, le développement se bloque à un stade qui est en rapport avec la quantité de *DNA* hétérologue injectée. Le sort du *DNA* injecté a été étudié par les méthodes cytochimiques (Unna, Feulgen), autoradiographiques (après injection de *DNA* tritié de *E. coli*) et biochimiques (chromatographie, hybridation moléculaire DNA-DNA selon Bolton et Mac Carthy). Ces techniques ont permis de démontrer que le *DNA* injecté dans l'un des blastomères se distribue dans les cellules-filles et qu'il tend, petit à petit, à passer dans les noyaux. Les techniques biochimiques montrent que, à ce moment, une partie du *DNA* de *E. coli* qui avait été micro-injecté se trouverait encore sous une forme non dégradée. L'arrêt du développement pourrait donc résulter d'une pénétration, dans les noyaux de l'œuf, de *DNA* hétérologue non dégradé.

Enfin, le laboratoire a commencé à s'intéresser aux effets de certains facteurs physiques (*R.X.*, *température*) sur le développement et les propriétés du *DNA* chez les Batraciens. Les œufs de Pleurodèles, après une irradiation immédiatement après la fécondation, peuvent atteindre le stade, décidément critique, de la blastula (comme après traitement par la mitomycine ou

l'hydroxyurée). Dans les coupes de blastulas bloquées, la fixation d'actinomycine marquée par le DNA est fortement diminuée dans les noyaux, plus faiblement dans le cytoplasme (H. Alexandre).

Quant aux chocs thermiques (1 h à 35 °C) au stade jeune gastrula, par exemple, ils bloquent le développement, tout en modifiant l'état dans lequel se trouve le DNA nucléaire : la cinétique de la réaction de Feulgen est, en effet, différente dans les noyaux des embryons traités par un choc thermique et dans ceux des témoins (M. Lamborot).

#### 4.2.2 *Hybridation létale* (M. Bieliavsky, J. Brachet, A. Cape, M. Decroly, S. Denis, A. Ficq, M. Geuskens, A.M. Preumont, J. Quertier et R. Tencer)

L'introduction dans l'œuf d'un spermatozoïde d'espèce étrangère provoque souvent, tant chez les Echinodermes que les Batraciens, le blocage du développement au « stade critique » (blastula avancée ou jeune gastrula). Le noyau étranger empêche les changements de métabolisme qui devraient normalement se produire à ce stade (ils se produisent, en effet, chez les haploïdes) : il s'agit notamment, de synthèse de m-RNA spécifiques dans les noyaux. Nous avons donc étudié les synthèses du DNA et du RNA, ainsi que quelques unes des propriétés de ces deux acides nucléiques, chez diverses combinaisons létales (*Rana esculenta* ♀ x *R. temporaria* ♂; *Bufo arenarum* (ou *vulgaris*) ♀ x *R. temporaria* ♂; *Paracentrotus* ♀ x *Arbacia* ♂).

Nos expériences ont montré que le DNA des hybrides létaux présente, au moment de leur blocage, certaines caractéristiques anormales : par exemple, lorsqu'on fait, chez l'hybride *Paracentrotus* ♀ x *Arbacia* ♂, des « pulses » à la thymidine, on constate que le DNA migre partiellement du noyau vers le cytoplasme lors du report dans l'eau de mer (A. Ficq et J. Brachet). D'autre part, la cinétique de la réaction de Feulgen est modifiée chez tous les hybrides létaux que nous avons étudiés : tout se passe comme si le DNA de ces hybrides était plus labile que celui des témoins (J. Brachet et A.M. Preumont). Il serait intéressant de déterminer les raisons de cette instabilité, à l'échelle moléculaire, en travaillant sur du DNA isolé à partir d'hybrides létaux.

Le RNA des hybrides létaux n'est pas normal non plus : il s'accumule en excès dans les noyaux et, après marquage à l'uridine et report dans le milieu normal, il ne migre que très lentement du noyau vers le cytoplasme (A. Ficq et J. Brachet). La solubilité du RNA nucléaire dans un tampon au phosphate est excessive; la composition en bases du RNA global synthétisé par les hybrides létaux n'est jamais identique à celle trouvée pour les témoins (J. Brachet, M. Cape et M. Decroly). Tout se passe, en somme, comme si des RNA anormaux se synthétisaient sur le DNA des hybrides létaux et qu'ils étaient incapables de se libérer de leur « template ».

Une autre caractéristique intéressante des hybrides létaux est la suivante : les proportions relatives du RNA et du DNA, dans les divers noyaux, est altérée. Il en résulte une mosaïque de noyaux, dont la plupart contiennent un excédent de RNA, mais dont d'autres en sont presque dépourvus. Les différences profondes qu'on observe d'un noyau à l'autre font penser que ce sont probablement des facteurs cytoplasmiques qui contrôlent les synthèses relatives du DNA et des RNA (J. Brachet, N. Bieliavsky et R. Tencer).

L'emploi des techniques autoradiographiques a montré que, chez les hybrides entre Batraciens l'incorporation de la thymidine dans le DNA est normale, (bien que, le DNA des hybrides létaux soit distribué de façon aberrante en couronne à la périphérie des noyaux). Par contre, l'utilisation de l'uridine pour la synthèse du DNA est très déficiente : chez les hybrides ce précurseur est utilisé de façon quasi exclusive pour la synthèse du RNA nucléaire. Celle-ci, nous l'avons vu, est d'ailleurs, en règle générale, excessive. L'incorporation des acides aminés

dans les protéines des hybrides létaux tend, elle aussi, à être exagérée. Notons encore que si on emploie un précurseur peu spécifique des macromolécules, le  $^{14}\text{CO}_2$  par exemple, son utilisation pour la synthèse des acides nucléiques (DNA et RNA) diminue progressivement et finit par cesser dans l'embryon létalement bloqué; mais la synthèse des protéines continue dans ces embryons où il n'y a plus de synthèses d'acides nucléiques. A ce moment, l'hybride létalement est l'équivalent d'une cellule anucléée (un fragment énucléé d'amibe, par exemple). Nous ignorons, malheureusement, tout au sujet de la nature des protéines synthétisées par les hybrides létaux; peut-être certaines de celles-ci sont-elles anormales et jouent-elles le rôle de répresseurs cytoplasmiques. Ajoutons que l'aspect en mosaïque des noyaux, que nous avons déjà signalé, chez les hybrides létaux, se retrouve parfaitement lorsqu'on examine des autoradiographies d'embryons traités par le  $^{14}\text{CO}_2$  ou l'uridine  $5\text{-}^3\text{H}$  (N. Bieliavsky, R. Tencer et J. Brachet).

De nombreuses tentatives, qui se sont soldées par des échecs, ont été faites pour essayer d'améliorer le développement des hybrides létaux par l'addition de substances variées (substances du cycle de Krebs, co-enzymes respiratoires, ribo- et d-ribonucléosides ou nucléotides, etc.). Retenons-en l'essentiel, car les détails nous entraîneraient très loin : la différence principale entre les hybrides létaux et les témoins réside dans le fait que la synthèse du RNA nucléaire est beaucoup plus sensible à l'addition des diverses substances essayées chez les hybrides. Selon le cas, les noyaux des hybrides s'enrichissent ou s'appauvrissent en RNA, alors que ceux des témoins ne sont que légèrement affectés. Tout se passe comme si les noyaux des hybrides létaux étaient « mal tamponnés » et réagissaient de façon excessive aux agents extérieurs. Cette conclusion confirme l'idée que la régulation (dont le siège est probablement cytoplasmique) des synthèses de DNA et de RNA nucléaire est déficiente dans les hybrides létaux (J. Brachet, J. Quertier et R. Tencer).

Ces essais, ainsi que le fait que la réduction du ribose semble importante dans les hybrides létaux (la mauvaise utilisation de l'uridine pour la synthèse du DNA l'indique) ont amené J. Brachet à formuler l'hypothèse que l'équilibre entre le TPNH et le TPN pourrait être modifié chez les hybrides : ceux-ci ont un métabolisme glucidique déficient (Gregg) et il se pourrait que la production du TPNH, qui est nécessaire à la réduction du ribose, soit également déficiente. Cette hypothèse a été formulée à propos des hybrides létaux entre Batraciens et elle n'a pas encore été éprouvée expérimentalement dans leur cas. Mais elle est certainement inexacte dans celui des hybrides entre Echinodermes : en effet, la teneur en TPNH des hybrides *Paracentrotus* ♀ x *Arbacia* ♂, au moment où ils se bloquent, est supérieure à celle des témoins *Paracentrotus* ♀ x *Paracentrotus* ♂. La différence est vraisemblablement due à ce que la teneur en TPNH diminue, à partir de la gastrulation, chez les témoins; elle semble rester constante chez les hybrides dont le développement s'est arrêté (S. Denis).

D'autres essais, assez peu fructueux, ont eu pour but d'empêcher la synthèse des RNA anormaux dans les hybrides : ceux-ci ont donc été traités par de l'actinomycine ou de la ribonucléase. Le résultat a été que la survie des hybrides a été prolongée sans que leur développement progresse. L'analyse cytochimique et autoradiographique des embryons traités à l'actinomycine a conduit aux conclusions suivantes : l'actinomycine inhibe davantage la synthèse du RNA dans les noyaux des hybrides que dans ceux des témoins. En fait, il n'est pas possible de déceler la présence de nucléoles dans les noyaux des hybrides létaux traités par l'actinomycine. Celle-ci n'empêche pas la synthèse du DNA à partir de thymidine; mais, si on utilise l'uridine- $5^3\text{H}$  comme précurseur, on peut constater que le RNA nucléaire des hybrides est, sur coupes histologiques, plus sensible à la RNase que celui des témoins (R. Tencer et J. Brachet).

Enfin, l'ultrastructure des hybrides entre oursins avec les témoins est actuellement étudiée par M. Geuskens; la différence la plus frappante qui ait été observée jusqu'à présent porte sur le cytoplasme : l'ergastoplasme fait pratiquement défaut chez les hybrides létaux.

## 4.3 — RNA

### 4.3.1 *Synthèse et localisation* (M. Cape, M. Decroly, F. Hanocq, E. Mariano, J. Quertier, A. Schram et P. Van Gansen)

En présentant plus haut un schéma des bases moléculaires de la morphogénèse chez les Batraciens, nous avons pris comme point de départ l'existence d'un gradient de polarité (animal-végétatif) dans la distribution des ribosomes, qui existeraient déjà dans l'œuf vierge; à ce gradient primaire viendrait se superposer, à la gastrulation, un gradient dorso-ventral qui correspondrait, surtout, à une production de m-RNA par les noyaux. Il devrait en résulter une distribution des polysomes le long d'un double gradient dorso-ventral et céphalo-caudal.

Le premier point à vérifier était, évidemment, l'existence d'un gradient de ribosomes dans les œufs de Batraciens : la situation était, en effet, devenue confuse à la suite d'un travail de Brown et Caston, qui concluaient à la quasi absence de ribosomes dans ces œufs, avant un stade très tardif du développement. La question a été étudiée, de façon parallèle, sur le plan biochimique (M. Decroly, M. Cape et F. Hanocq) et sur celui de la microscopie électronique (P. Van Gansen). Les réponses ont été claires : bien que de nombreuses difficultés techniques aient dû être surmontées, il a été possible d'isoler, à tous les stades du développement du Xénope, des ribosomes dont la constante de sédimentation est normale (60-70 S) et dont l'aspect au microscope électronique est classique. L'examen au microscope électronique a montré en outre, sur des coupes ultra-fines, que ces œufs contiennent de très nombreux ribosomes et que ceux-ci sont beaucoup plus abondants au pôle végétatif. Ces ribosomes semblent être plus volumineux dans les œufs vierges que dans les œufs fécondés; dans ces derniers, la taille des ribosomes est parfaitement normale. Ils sont, dans les œufs fécondés, souvent associés en chaînettes, qui correspondent peut-être à des polysomes. Un fait est, en tout cas, certain : c'est qu'il existe effectivement un gradient animal végétatif dans la distribution des ribosomes. Il est probable (et nous verrons plus loin d'autres raisons de le croire) que, déjà dans l'œuf fécondé, une partie de ces ribosomes se trouve sous la forme de polysomes. La question de savoir si les ribosomes (monosomes) voient leur composition chimique se modifier au cours du développement reste ouverte; une étude actuellement en cours (J. Quertier et F. Hanocq) sur les protéines des ribosomes des œufs d'oursin montre qu'elles demeurent très semblables (sinon identiques) de l'œuf indivis aux larves nageantes (plutei).

Passons maintenant à la question des *polysomes* : leur isolement, par les méthodes biochimiques, présente de sérieuses difficultés qui sont en passe d'être vaincues. Remarquons à ce propos que les difficultés qui ont été rencontrées par tous les chercheurs qui ont essayé d'isoler les ribosomes des œufs de Batraciens semblent avoir des raisons multiples : abondance des lipides (qui forment des membranes dont il est difficile de séparer les ribosomes par les détergents), de glycogène (qui tend à se sédimenter avec les microsomes et les polysomes), présence de plaquettes vitellines (qui contiennent du RNA et dont la rupture, lors de broyage des œufs, provoque l'apparition de facettes abrasives qui peuvent briser les polysomes, etc.).

La microscopie électronique révèle aussi la présence de très curieuses structures dans les blastulas et les gastrulas : ce sont des vacuoles, parfois intracellulaires, plus souvent situées entre les blastomères, qui contiennent des granules ressemblant à des ribosomes qui seraient unis en chaînettes par un mince filament : on a l'impression qu'il s'agit de polysomes enfermés, à l'état presque pur, dans des vacuoles. Il est à noter que, conformément aux prévisions, ces « vacuoles à polysomes » sont surtout abondantes dans la région du pôle animal et dans la moitié dorsale de la gastrula (neuroblaste et chordoblastes). Une telle distribution correspond parfaitement avec ce que nous savons sur la production de RNA par les noyaux (observations autoradiographiques faites jadis au laboratoire, confirmées récemment dans celui de A.E. Mirsky) et sur l'intensité des synthèses protéiques dans les différents territoires de la gastrula. Toutefois, il convient encore d'être prudent dans l'interprétation des images observées au microscope électronique, en raison

de l'abondance de glycogène particulière dans les œufs de Batraciens; des confusions resteront possibles tant que la nature ribonucléoprotéique des granules observés n'aura pas été prouvée (P. Van Gansen).

La *synthèse des RNA* au cours du développement dans les œufs de Xénope a été longuement étudiée par M. Decroly et M. Cape : les embryons ont été soumis à des « pulses » au  $^{32}\text{P}$ , de durées variables, et la composition en bases des RNA néosynthétisés a été déterminée. Ces expériences ont montré que la synthèse des RNA est très faible pendant la segmentation; elle augmente fortement à la gastrulation ( $5 \times$ ) et quintuple encore pendant la neurulation. Dans la neurula des gradients céphalocaudaux et dorsoventraux dans la synthèse des RNA peuvent être décelés. Les RNA néosynthétisés ressemblent, au point de vue de leur composition en bases, aux m-RNA; ce fait n'est pas surprenant, si on songe que les nucléoles (dont les RNA sont les précurseurs de m-RNA) font leur apparition après la segmentation et qu'ils se développent de plus en plus par la suite. Il est hors de doute, toutefois, qu'une synthèse de RNA ressemblant au DNA (m-RNA) se produit parallèlement. Les résultats obtenus concordent bien, à des détails près, avec ceux publiés par D. Brown aux Etats-Unis.

Enfin, une technique pour l'*isolement des noyaux*, aux divers stades du développement du Xénope, a pu être mise au point, malgré de très sérieuses difficultés techniques, par E. Mariano et A. Schram. Il a été établi que si leur teneur en DNA demeure constante pendant tout le développement, ils s'enrichissent en RNA à partir d'embryons qui avaient été soumis à des « pulses » courts (20 mn) au  $^{32}\text{P}$  et ont été traités au phénol à 45 et à 65 °C suivant la méthode de Georgiev. La fraction isolée à 45 °C est hétérogène et formée des deux r-RNA (18S et 28S), ainsi que de t-RNA (4 S); sa composition globale en bases est pratiquement identique à celle du r-RNA. Par contre, la fraction extraite au phénol à 65 °C a une composition en bases très différente et se marque très rapidement. Sa composition en bases se modifie au cours de la neurulation, ce qui pourrait indiquer (comme l'a montré H. Denis par une toute autre méthode) que les m-RNA différents sont synthétisés au cours des différentes étapes du développement. Malheureusement, le RNA de cette fraction extraite à 65 °C ne forme qu'un seul pic, dont la constante de sédimentation est basse (4S). Il s'agit probablement d'un produit de dégradation de m-RNA de poids moléculaires plus élevés.

#### 4.3.2 *Effets des inhibiteurs de la synthèse des RNA* (E. Ambellan, J. Brachet, H. Denis, V. Heilporn, E. Hubert et P. Malpoix)

Si le schéma indiqué plus haut est correct, un traitement des œufs par de l'*actinomycine* (inhibiteur des synthèses de RNA) devrait avoir les conséquences suivantes : *peu ou pas d'effets* sur la *segmentation*, puisque les synthèses de RNA sont faibles à ce moment; *inhibition de la différenciation céphalocaudale et dorsoventrale par la suite*.

Ce sont bien ces résultats qui ont été obtenus par J. Brachet et H. Denis : même si on injecte de l'actinomycine <sup>(1)</sup> dans des œufs fécondés de Pleurodèles, plusieurs cycles mitotiques s'accomplissent. Toutefois, des anomalies chromosomiales ne tardent pas à se manifester, sans doute parce que l'actinomycine en se combinant au DNA, finit par empêcher sa réplication. Le développement se bloque au stade critique de la blastula, au moment où les synthèses de RNA débutent dans les noyaux. Aux stades ultérieurs, on constate que la gastrulation, suivant les espèces considérées, est plus ou moins sensible à l'actinomycine; si elle n'a pas été trop profondément perturbée, on obtient des embryons très anormaux (microcéphalie, système nerveux rudimentaire, etc.) : leur différenciation, tant céphalocaudale que dorsoventrale, est extrêmement rudimentaire. Il est curieux de constater que certains organes (vésicule auditive, pronéphros) échappent, dans une large mesure, aux effets de l'actinomycine : les embryologistes savent que ces organes ont une certaine « prédisposition » à l'autodifférenciation et il est possible que leurs

<sup>(1)</sup> Don généreux de la firme Merck, Sharpe et Dohme.

territoires présomptifs contiennent, dès le stade gastrula, une partie des m-RNA qui sont requis pour leur différenciation. Ajoutons que des résultats fort semblables ont été obtenus sur de jeunes embryons de poulet par V. Heilporn.

Puisque l'actinomycine inhibe la formation du système nerveux, on peut se demander si elle agit de façon préférentielle sur le *pouvoir inducteur de l'organisateur* ou sur la « *compétence* » (capacité de répondre au stimulus inducteur) de l'épiblaste. Des expériences de H. Denis ont apporté une réponse claire à cette question : l'actinomycine inhibe *à la fois* la compétence de l'épiblaste et le pouvoir inducteur de l'organisateur. Mais l'inhibition est beaucoup plus rapide dans le cas de l'épiblaste dont la compétence est perdue en quelques minutes en présence d'actinomycine. Une synthèse de RNA dans les noyaux (sans doute des m-RNA) est donc indispensable pour que l'induction du système nerveux soit possible.

Les *effets biochimiques* de l'actinomycine ont été étudiés aussi par H. Denis : elle inhibe fortement l'incorporation de l'uridine dans le RNA des noyaux. Aux stades jeunes (morulas), elle est sans effets sur l'incorporation de la leucine dans les protéines (rappelons que, à ces mêmes stades, elle n'a pas d'effets non plus sur le développement). Par contre, aux stades plus avancés, où l'actinomycine inhibe la morphogénèse (gastrulas, neurulas), elle ralentit la synthèse des protéines. L'inhibition est plus forte dans les neurulas (surtout leur moitié dorsale) que dans les gastrulas. Ce résultat est parfaitement logique et concorde bien avec tout ce que nous savons des synthèses de protéines aux différents stades et dans les diverses régions de l'embryon.

Il était intéressant de comparer aux effets de l'actinomycine, ceux de répresseurs *naturels* de la synthèse de RNA, les *histones* : on sait que ces protéines basiques sont combinées au DNA chromosomial et que leur présence en excès empêche la transcription de ce DNA. Les expériences, jusqu'à présent, ont été limitées à l'étude d'histones hétérologues (fraction riche en lysine, extraite à partir de thymus de veau). Les résultats ressemblent fort, comme il fallait le prévoir, à ceux qui viennent d'être décrits pour l'actinomycine : en particulier, la segmentation est possible même après micro-injection d'histones dans les œufs indivis (J. Brachet et E. Hubert). Par la suite, l'analyse des résultats est compliquée du fait que les histones (probablement en raison de leur caractère basique) exercent des effets importants sur le *cortex* des embryons, qui se contracte fortement : exogastrulation, fermeture brutale de la plaque médullaire. Ces effets secondaires troublent, évidemment, la morphogénèse et rendent l'interprétation des résultats assez difficile. La pénétration des histones dans les œufs est, d'ailleurs, faible et leurs effets ne peuvent guère s'exercer que sur quelques (2-3) couches superficielles de cellules. L'analyse cytochimique et autoradiographique de ces expériences a montré que les histones n'inhibent pas sensiblement la synthèse du DNA; par contre, celle des RNA nucléaires est fortement diminuée. Il semble bien que les histones, à l'inverse de l'actinomycine, inhibent davantage la synthèse du RNA chromosomial que celle du RNA nucléolaire. Le fait serait intéressant, s'il se confirmait : dans cette éventualité, nous disposerions de deux inhibiteurs distincts de la synthèse du RNA, agissant sur des portions différentes du DNA nucléaire. Dans les œufs injectés d'histones, l'incorporation de l'arginine est inhibée uniquement au pôle végétatif. D'une manière générale, seules les cellules issues du blastomère injecté présentent une inhibition importante des divers précurseurs dans les macromolécules correspondantes.

Une étude parallèle a été effectuée, sur l'embryon de poulet, par P. Malpoix : les histones de thymus de veau bloquent le développement des embryons de 36 à 48 h, mais sans présenter d'effets bien spécifiques. Comme chez les Batraciens, elles inhibent l'incorporation de la phénylalanine sans affecter beaucoup celle de la thymidine.

Il nous a paru intéressant de comparer aux histones riches en lysine un produit de synthèse, la *polylysine*. L'échantillon utilisé avait, comme les histones, un poids moléculaire d'ordre de 10 000. En fait, les résultats ont été exactement les mêmes que ceux obtenus avec les histones : blocage au stade blastula après micro-injection, exogastrulation ensuite. Ces effets exercés sur les membranes par la polylysine sont encore plus marqués que ceux des histones. Chez l'œuf d'oursin aussi, la polylysine tend à séparer les blastomères, ce qui conduit à la formation fréquente

de larves doubles (jumeaux ou frères siamois). Ces anomalies cytoplasmiques, chez les Batraciens, se ressemblent aussi : mitoses bloquées, pycnoses plus ou moins nombreuses, noyaux volumineux et bourgeonnants, cellules plurinucléées, réduction des nucléoles abondent dans les embryons traités à la polylysine. Ceux-ci présentent, sur le plan embryologique, une tendance à la *mésodermsation* (réduction du système nerveux aux dépens de la corde et des somites) (J. Brachet et E. Hubert).

Mentionnons encore quelques expériences où des *polynucléotides de synthèses* (m-RNA anormaux) ont été injectés dans des œufs : il s'agissait soit d'acide polyadénylique (*poly A*), soit d'acide polyuridylique (*poly U*); ils ont été injectés soit seuls, soit avec l'acide aminé qui leur correspond dans le code génétique (*lysine* et *phénylalanine*, respectivement). On pouvait espérer que l'introduction de poly A et de lysine conduirait à la production de polylysine, qui devrait exercer les effets qui viennent d'être décrits. En fait, les résultats n'ont rien eu de bien encourageant : la poly A est relativement peu toxique et, après injection au stade 2-4 blastomère, un arrêt du développement ne s'observe qu'au cours de la neurulation. La lysine, seule, n'exerce aucun effet visible sur le développement. L'addition de lysine au poly A ne renforce en rien les effets de ce dernier sur la morphogénèse.

Notons que l'effet du poly A est très différent de celui de l'ATP, qui a été étudié, dans notre laboratoire, par E. Ambellan : cette substance, comme les histones et la polylysine, provoque de l'exogastrulation et une fermeture accélérée de la plaque médullaire. Sur le plan biochimique, elle stimule les synthèses de RNA et de protéines, sans affecter celle du DNA.

Quant au poly U, il est nettement plus toxique que le poly A et le RNA de levure : l'arrêt du développement s'observe dès la gastrulation. L'addition de phénylalanine au poly U aggrave la situation et le blocage est encore plus précoce. Mais la phénylalanine est, malheureusement, toxique par elle-même et il peut donc s'agir de simples effets additifs. On voit que les résultats de ces expériences ne sont pas suffisamment prometteurs pour qu'on entreprenne une analyse serrée des changements biochimiques que provoque l'injection des m-RNA artificiels dans les œufs de Batraciens (J. Brachet et E. Hubert).

Les effets sur le développement d'une autre substance encore ont été étudiés par J. Brachet : c'est le *lévorphanol*, un analogue de la morphine qui, chez les bactéries, supprimerait, de façon assez élective, la synthèse des r-RNA. Chez les Batraciens, le lévorphanol n'a exercé aucun effet sur la morphogénèse primaire : on obtient des têtards, mais qui restent immobiles et dont le cœur ne bat pas. A l'examen cytologique, les nucléoles sont réduits, mais la basophilie cytoplasmique est généralement normale : il est donc peu probable que le lévorphanol ait arrêté efficacement et spécifiquement la synthèse des r-RNA dans le cas des œufs de Batraciens. On remarque surtout, dans les têtards immobiles, une curieuse dégénérescence des structures fibrillaires (cristallins, muscles); elle semble résulter d'un vacuolisation des cellules, jointe à un arrêt de la résorption du vitellus. Ajoutons que, chez l'oursin, le lévorphanol bloque beaucoup plus rapidement le développement : la blastula constitue le stade critique, quelle que soit la concentration en lévorphanol utilisée. On ne peut en dire plus, au sujet du lévorphanol, tant que ses effets n'auront pas été analysés par des méthodes biochimiques.

#### 4.4 — Protéines

##### 4.4.1 Synthèse (N. Bieliavsky, J. Brachet, E. Hubert, F. Legros et R. Tencer)

Les efforts du laboratoire ont surtout porté sur les stades jeunes du développement, puisqu'on sait que les synthèses protéiques sont importantes à partir de la gastrulation (surtout dans la moitié dorsale). La question principale était la suivante : se produit-il des synthèses de protéines (nucléaires ou cytoplasmiques?) dès la segmentation, c'est-à-dire au moment où le

développement est possible même après injection d'actinomycine (donc, en l'absence de toute synthèse de nouvelles molécules de RNA)? Si oui, ces synthèses se déroulent-elles le long du gradient animal-végétatif de distribution des ribosomes?

C'est la méthode autoradiographique qui a été utilisée afin de répondre à ces questions, puisque c'est la localisation des protéines synthétisées qui nous intéressait particulièrement. Le matériel biologique employé a été aussi varié que possible : cellules de morulas dissociées au citrate, œufs micro-injectés d'acides aminés au stade 2-4 blastomères, œufs intacts traités par du  $^{14}\text{CO}_2$ . Les résultats ont été sensiblement les mêmes quelles que soient les conditions expérimentales adoptées ou les précurseurs administrés : la synthèse des protéines est intense, tant dans le noyau que dans le cytoplasme, dès le début de la segmentation. Les autoradiographies montrent, en outre, l'existence d'un très net gradient dans la synthèse des protéines cytoplasmiques décroissant du pôle animal au pôle végétatif. La situation est moins claire en ce qui concerne les noyaux, parce qu'ils sont beaucoup plus volumineux au pôle végétatif qu'au pôle animal. Si on tient compte de cette différence de volume, il semble bien que la synthèse des protéines nucléaires soit du même ordre de grandeur dans tous les noyaux, quelle que soit leur localisation dans l'embryon : elle ne serait donc pas dominée par l'existence du gradient cytoplasmique de synthèses protéiques.

On peut tirer de ces expériences une conclusion importante : s'il existe un gradient animal-végétatif pour les synthèses de protéines dans les œufs fraîchement fécondés (nous ignorons, malheureusement, encore s'il en va déjà de même dans les œufs vierges), cela signifie qu'il doit exister, dès ce stade, un gradient identique dans la distribution des polysomes. Comme il ne se produit pas de synthèse de m-RNA à ce moment, il faut en déduire que les ribosomes sont unis les uns aux autres par des fibres de m-RNA préexistants. Il s'agit, sans doute, de m-RNA stables, qui sont passés dans le cytoplasme lors de la maturation de l'oocyte : la situation, on le voit, serait la même dans les œufs des Batraciens que dans ceux des oursins, dont le cas a été discuté plus haut.

#### 4.4.2 Effets des inhibiteurs des synthèses protéiques (J. Brachet, F. Legros et P. Malpoix)

Si des synthèses de protéines importantes se déroulent dès la segmentation, on devrait s'attendre à voir le développement se bloquer rapidement après l'administration d'un inhibiteur de ces synthèses aux œufs; la puromycine, la cycloheximide, etc. devraient donc arrêter le développement de façon beaucoup plus efficace que l'actinomycine. C'est bien là ce qu'ont montré les expériences de J. Brachet et F. Legros.

La micro-injection de puromycine, au stade 4-8 blastomères, provoque un arrêt rapide du développement (arrêt du clivage au stade 64-128 blastomères). L'activité mitotique est donc étroitement liée à une synthèse de protéines, alors qu'elle n'exige pas, chez les œufs de Batraciens, de synthèse de RNA. Il a été, bien entendu, vérifié que la puromycine, après injection dans les œufs, inhibe réellement la synthèse des protéines : on n'observe pas d'effet notable sur l'incorporation de la leucine dans les protéines, pendant les 3 heures qui suivent l'injection de puromycine, mais la synthèse des protéines cytoplasmiques s'arrête à ce moment de façon presque totale : c'est au cycle suivant de division que les mitoses se bloquent. L'inhibition de la synthèse des protéines nucléaires et de celle du DNA (suivie au moyen de thymidine- $^3\text{H}$ ) est plus tardive : elle semble être secondaire à l'arrêt de la synthèse des protéines cytoplasmiques (peut-être la synthèse d'un enzyme intervenant dans la synthèse du DNA). Le résultat obtenu est, en tous cas, logique, puisque c'est au niveau des polysomes cytoplasmiques que la puromycine agit principalement. Les expériences montrent aussi que, comme dans les œufs d'oursin, la formation de l'appareil mitotique requiert, chez les Batraciens, une synthèse préalable de protéines; celle-ci serait contrôlée au niveau de la « traduction » puisqu'elle n'a pas besoin de la synthèse de nouveaux m-RNA pour être dirigée.

Aux stades ultérieurs, la puromycine est moins aisée à manipuler que l'actinomycine, parce que sa pénétration dans les œufs de Batraciens est moins bonne : on obtient, néanmoins, en l'ajoutant de l'extérieur des embryons microcéphales qui ressemblent — comme on devait s'y attendre — à ceux qui ont été décrits plus haut après traitement à l'actinomycine. Afin d'essayer de surmonter ces difficultés dues à la faible perméabilité des œufs de Batraciens à la puromycine, cette substance a été introduite par micro-injection, dans le blastocèle ou l'archentéron, aux stades morula, blastula ou gastrula : l'injection aux stades jeunes (morulas, blastulas) provoque l'arrêt de développement en 8 heures, avec accumulation d'anomalies mitotiques semblables à celles que l'on observe aux stades plus jeunes. L'injection de puromycine aux stades blastulas avancées ou jeunes gastrulas entraîne un blocage du développement en cours de gastrulation; au stade gastrula avancée, elle donne naissance à des embryons microcéphales. On peut en déduire que des synthèses de protéines sont indispensables à tous les stades du développement : *qu'il s'agisse de divisions cellulaires, de mouvements gastruléens ou de l'induction neurale, la synthèse de protéines nouvelles est donc absolument requise* (J. Brachet et F. Legros).

Ces études ont été étendues à l'*embryon de poulet* par P. Malpoix : la puromycine inhibe rapidement leur développement aux stades jeunes, mais la fermeture du système nerveux est relativement résistante. Des observations autoradiographiques ont montré que c'est la synthèse des protéines (incorporation de la leucine) qui est touchée en premier lieu; plus tard, au moment où les pycnoses deviennent fréquentes, la synthèse de DNA est atteinte à son tour; c'est la synthèse du RNA (incorporation de cytidine) qui est moins sensible à la puromycine.

D'autres inhibiteurs des synthèses protéiques sont actuellement étudiés par F. Legros : la *cycloheximide*, quel que soit le stade où elle est administrée et quel que soit le mode de traitement (micro-injection ou simple addition au milieu extérieur) bloque plus rapidement le développement des œufs de Batraciens, à concentrations égales : deux mitoses de segmentation, au maximum, sont possibles après des traitements par la cycloheximide à une concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Il est curieux de noter à ce sujet que les œufs d'oursin, dont la segmentation est bloquée de façon immédiate par la puromycine, sont remarquablement insensibles à la cycloheximide (J. Brachet) : ces différences résultent sans doute d'une perméabilité inégale aux inhibiteurs chez les diverses espèces; mais on ne peut oublier que la cycloheximide et la puromycine n'agissent pas de la même manière sur les polysomes et la question mériterait donc d'être examinée de plus près. Revenons-en aux recherches de F. Legros sur les œufs de Batraciens : il est à noter que l'effet inhibiteur de la cycloheximide semble être tout à fait indépendant du *stade* du développement.

Cette constatation confirme l'idée, développée plus haut, que des *synthèses protéiques sont indispensables à la morphogénèse*, qu'il s'agisse de la segmentation (mitoses), de la gastrulation (mouvements morphogénétiques), de la neurulation (induction primaire et organogénèse) ou de la différenciation histologique des têtards. Leur analyse autoradiographique des effets biochimiques de la cycloheximide a commencé : elle a déjà montré que l'inhibition de la synthèse des protéines nucléaires et cytoplasmiques est quasi totale déjà 3 heures après l'injection.

Les effets sur la morphogénèse de deux autres inhibiteurs des synthèses protéiques, la streptovitacine A et la pactamycine <sup>(1)</sup>, sont actuellement étudiés par F. Legros : la streptovitacine A est moins efficace, à concentrations égales, que la cycloheximide lorsqu'on l'ajoute de l'extérieur; mais, en micro-injections, les effets des deux inhibiteurs (qui agissent de façon identique au point de vue biochimique) deviennent les mêmes. Quant à la pactamycine, elle se situe entre la cycloheximide et la streptovitacine A quand elle est ajoutée au milieu extérieur; à nouveau elle se comporte comme la puromycine, la cycloheximide et la streptovitacine A en micro-injections. Cette étude se poursuit actuellement; mais l'impression qui se dégage, dès maintenant, est que les divers inhibiteurs ne diffèrent les uns des autres que par leur vitesse de pénétration dans les œufs.

(1) Nos vifs remerciements vont au Dr. C. Baglioni (LIGB, Naples) pour le don généreux de ces deux antibiotiques.

Quelques mots enfin, au sujet des effets d'une substance bien différente, la *formamide*, qui est plus efficace que l'urée pour rompre les liaisons hydrogène. Administrée à concentrations élevées (1M-2M), elle bloque rapidement la segmentation des œufs de Batraciens en provoquant une dégénérescence rapide du fuseau. L'effet est réversible tant que celui-ci est seul à être atteint, mais les anomalies chromosomiales deviennent nombreuses dans les œufs qui ont été répartis dans le milieu normal. Une action plus prolongée provoque la destruction des asters et la pycnose des chromosomes (dont le DNA a été partiellement dénaturé, à en juger par ses affinités tinctoriales). Ces expériences confirment l'importance des liaisons hydrogène pour le maintien de la structure du fuseau.

À concentrations plus faibles (0,4 - 0,1 M), le développement est relativement normal à part une atrophie des branchies, qui sont bourrées de noyaux pycnotiques. On note aussi une forte inhibition de l'utilisation du vitellus et, chez *Rana temporaria*, un développement excessif de la chorde, qui peut envahir les tissus avoisinants (système nerveux, somites, endoblaste). Cette « chordalisation », qui avait déjà été observée après traitement à l'urée, ne s'obtient que chez cette espèce.

#### 4.4.3 Synthèse de l'hémoglobine chez l'embryon de poulet (A. Emelinckx, S. Limbosch, et P. Malpoix)

Ce travail qui a été principalement effectué par P. Malpoix a pour but l'étude de l'apparition d'une *protéine spécifique* (l'hémoglobine) et de cellules spécialisées (les globules rouges) dans une région bien définie (îlots sanguins de Pander-Wolff) du jeune embryon de poulet. On s'est efforcé soit de stimuler (ou d'accélérer) la synthèse de l'hémoglobine, soit de l'inhiber de façon aussi élective que possible.

Parmi les substances essayées, il y en a trois qui se sont montrées, dans une certaine mesure, comme capables de *favoriser* la synthèse de l'hémoglobine dans de jeunes embryons de poulet en explantation (P. Malpoix) : ce sont le *RNA des réticulocytes*, l'*érythropoïétine* (que nous devons à l'amabilité du Dr. J. Naets) et l'*acide v-aminolévulinique* (ALA). L'addition du *RNA* isolé à partir de réticulocytes de poules rendues anémiques, aux jeunes embryons de poulet provoque des effets qui sont, malheureusement, trop variables pour qu'on puisse conclure avec certitude. Si, dans la majorité des expériences, une stimulation de la synthèse de l'hémoglobine a été observée, d'autres essais sont restés négatifs. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque les embryons étaient cultivés en présence de protéines : celles-ci provoquaient sans doute de la pinocytose, qui favoriserait la pénétration dans l'embryon du *RNA* qui avait été ajouté au milieu.

Les effets de l'*érythropoïétine* ont été suivis de plus près : si on suit l'incorporation du  $^{59}\text{Fe}$  dans le hème et les protéines résiduelles de l'aire vasculaire des jeunes embryons de poulet, on observe régulièrement une augmentation, qui va de 15 à 60 %. L'*érythropoïétine*, après un traitement de 2 heures, stimule aussi, de 50 à 80 %, l'incorporation de l'uridine dans le *RNA*; mais cet effet favorable n'est que momentané : il tombe à 25-40 % après 20 heures et disparaît ultérieurement. La teneur en *RNA* global est, elle aussi, augmentée de 25 à 40 % après un traitement de 20 heures. Il semble bien que l'âge des cellules joue un rôle déterminant dans leur réponse à l'*érythropoïétine*.

Les effets de l'ALA n'ont encore été étudiés que de façon très préliminaire : ce précurseur des porphyrines paraît inhiber l'incorporation de l'uridine dans le *RNA* et stimuler celle de la phénylalanine dans les protéines de l'aire vasculaire de l'embryon de poulet.

Passons aux effets des *inhibiteurs* (*puromycine*, *actinomycine* et *histones*) des synthèses de protéines et de *RNA*. La *puromycine* inhibe sensiblement (20 à 70 % selon la concentration employée) l'incorporation du  $^{59}\text{Fe}$  dans le hème et dans les protéines résiduelles; il est probable qu'une partie du Fer radioactif s'incorpore dans la ferritine, dont la synthèse précéderait celle de l'hémoglobine. Dans d'autres expériences, les effets de la *puromycine* ont été étudiés sur des cellules sanguines isolées à partir d'embryons de poulet *plus âgés* (5 à 18 jours au lieu de

1 1/2-2 jours). Ces cellules cessent d'être le siège d'une synthèse d'acides nucléiques (DNA et RNA) dès le 6<sup>e</sup> jour, alors que l'incorporation des acides aminés dans les protéines se poursuit jusqu'au 14<sup>e</sup> jour : la durée de vie du m-RNA qui dirige la synthèse de l'hémoglobine serait donc de l'ordre de 9 jours dans ces cellules, qui sont très sensibles à la puromycine. Celle-ci inhibe fortement la synthèse des protéines; elle touche celle du DNA dans la mesure où il apparaît des pycnoses dans les cellules traitées et elle n'affecte guère celles du RNA. C'est la synthèse des r-RNA qui est atteinte de façon préférentielle (P. Malpoix et S. Limbosch).

L'étude n'en est pas qu'à ses débuts en ce qui concerne les effets de l'*actinomycine* : celle-ci inhibe fortement l'incorporation de la lysine dans les protéines de l'embryon de poulet. Elle diminue dans la même mesure (65-80 %), l'incorporation de l'uridine dans le RNA. Par contre, l'actinomycine est relativement peu efficace (inhibition de 15 à 35 %) en ce qui concerne l'incorporation de la valine dans les protéines. L'embryon de poulet pourrait donc constituer un matériel très favorable pour préciser si la synthèse des histones se fait par voie différente de celle des autres protéines; nous reviendrons plus loin sur cette question, à propos du travail de F. Bosseler (P. Malpoix).

Enfin, les effets des *histones* sur la synthèse de RNA dans les érythroblastes de 5 à 6 jours ont été étudiés par A. Emelinckx et P. Malpoix : des histones homologues (préparés à partir de globules rouges de poule adulte) et hétérologues (thymus de veau) ont été préparées et séparées en de nombreuses fractions. Seules les histones homologues riches en arginine ont exercé un effet inhibiteur marqué (50 %) de l'incorporation de l'uridine dans le RNA des érythroblastes d'embryons de poulet âgés de 5 j. 17 h. Ces mêmes fractions ont produit, de façon paradoxale, une *stimulation* de l'incorporation de l'uridine et de la phénylalanine dans les noyaux isolés à partir des érythroblastes ou des embryons entiers de ce même âge. Ce paradoxe, qui reste à expliquer, tient peut-être à l'action (à laquelle nous avons fait allusion à plusieurs reprises) des histones sur les membranes cellulaires.

#### 4.5 — Production d'énergie au cours du développement des Batraciens (S. Denis et T. Devlin)

On a vu plus haut, à propos de la fécondation de l'œuf d'oursin, les raisons pour lesquelles une étude systématique des effets de différents inhibiteurs des phosphorylations oxydatives et de la respiration sur la morphogénèse, la respiration et la teneur en ATP est souhaitable. Une pareille étude a été commencée sur les œufs de pleurodèles, avec les résultats suivants.

L'oligomycine n'inhibe le développement (sans qu'il y ait un stade sélectif d'inhibition) qu'après une longue phase de latence (48 h au moins). Elle n'est pas due à une perméabilité insuffisante de l'œuf vis-à-vis de l'oligomycine : celle-ci, en effet, inhibe fortement la respiration au bout de 2 h déjà. Par contre, la teneur en ATP des œufs traités à l'oligomycine ne varie que fort peu.

Au contraire, le dinitrophénol agit de façon presque immédiate : le développement se bloque, la respiration s'élève fortement et la teneur en ATP diminue rapidement de 50 %. L'oligomycine est capable de contrecarrer partiellement l'effet du dinitrophénol. En effet, lors d'un traitement combiné des œufs par l'oligomycine et le DNP, la teneur en ATP ne diminue que de 27 %. Toutefois, l'oligomycine est sans effet sur la respiration stimulée par le dinitrophénol et sur le blocage du développement.

L'oligomycine diminue, après un traitement bref (1 h), l'incorporation totale de <sup>32</sup>P dans les œufs de Xénope; l'incorporation est réduite dans le DNA et le RNA tout en demeurant inchangée en ce qui concerne les phospholipides et les phosphoprotéines. Après un traitement plus long par l'oligomycine (5 h 30), l'incorporation totale de <sup>32</sup>P augmente : elle s'élève dans le RNA, les phospholipides et les phosphoprotéines, mais elle diminue dans le DNA.

Les effets sur le développement d'inhibiteurs de la respiration (cyanure, amytal et antimycine A) ont été également étudiés : ils affectent tous spécifiquement la gastrulation. Par contre, la roténone inhibe la respiration et arrête la morphogénèse quasi instantanément.

Ces expériences montrent que la division cellulaire (segmentation) s'arrête lorsque la teneur en ATP tombe en-dessous d'une valeur critique; la suppression de la consommation d'oxygène n'empêche pas nécessairement la segmentation. Elle bloque, par contre, la gastrulation : les mouvements morphogénétiques sont donc plus dépendants de la respiration que les mitoses.

## 5 — ACETABULARIA

### 5.1 — Considérations théoriques (J. Brachet)

On sait que l'intérêt d'*Acetabularia*, au point de vue de la Biologie générale, réside dans la grande taille de cette algue unicellulaire, dans la facilité avec laquelle on peut la couper en deux fragments (nucléé et anucléé) et, surtout, dans les remarquables capacités de régénération des fragments anucléés. Comme l'a montré J. Hämmerling, dès 1934, ces fragments sont capables de former une structure complexe, le «chapeau», qui sert, normalement, à la reproduction de l'algue. La structure de ce chapeau, qui est caractéristique de chaque espèce d'*Acetabularia*, est génétiquement déterminée; néanmoins, c'est un chapeau typique qui se forme dans les fragments anucléés. Hämmerling a conclu de ses expériences que le noyau des *Acetabularia* produirait des «substances morphogénétiques» possédant une spécificité d'espèce. Ces substances passeraient du noyau dans le cytoplasme et s'accumuleraient à l'apex de la tige, à l'endroit où le chapeau se formera plus tard. Nos propres expériences (J. Brachet) basées sur le fait qu'il ne se produit pas de régénération à l'obscurité, ont permis d'attribuer aux «substances morphogénétiques» une durée de vie de 2 à 3 semaines. Il est à noter que les fragments anucléés sont capables d'une importante synthèse nette de protéine (leur teneur en protéines peut tripler) et que cette synthèse s'arrête au bout de 3 semaines environ (J. Brachet et H. Chantrenne). Parmi les protéines synthétisées se trouvent divers enzymes : les fragments anucléés doivent donc posséder toute l'information requise pour la synthèse de nombreuses protéines spécifiques.

Transposée en termes de Biologie moléculaire, la notion de «substances morphogénétiques» doit se muer, évidemment, en celle de *RNA messagers* (ou informationnels) : selon cette hypothèse, ce seraient des m-RNA qui seraient formés par le noyau, déversés dans le cytoplasme et accumulés dans la pointe de la tige, où ils pourraient survivre pendant 2 à 3 semaines avant d'être dégradés. Cette hypothèse de travail simple, que nous avons proposée en 1961, et qui a servi de base à nos recherches, est actuellement adoptée aussi par les chercheurs du groupe Hämmerling (notamment Werz et Zetsche).

Cette identification des substances morphogénétiques aux m-RNA trouve un certain appui dans les expériences de H. Stich et W. Plaut, qui ont été répétées et confirmées dans notre laboratoire (J. Brachet, F. de Vitry) : si on traite par de la ribonucléase (simplement ajoutée à l'eau de mer) des algues qui ont été coupées en deux, les fragments anucléés perdent irréversiblement la capacité de régénérer; les fragments nucléés ne régénèrent pas tant qu'ils sont en présence de RNase; mais la formation de chapeaux reprend peu après leur report dans de l'eau de mer normale. L'explication qui a été proposée pour ces faits est la suivante : les m-RNA accumulés dans les fragments anucléés seraient détruits irrémédiablement par la RNase; dans les fragments nucléés, les noyaux pourraient reformer des m-RNA lors du report dans de l'eau de mer normale. Rien ne permet, à l'heure actuelle, d'éliminer cette explication, ni d'affirmer qu'elle est correcte : ce n'est que tout récemment que, comme on le verra plus loin, nous sommes parvenus à isoler les polysomes des *Acetabularia* et l'effet de la RNase (ajoutée dans les milieux) sur ces polysomes

n'a pas encore été étudié. Nous verrons aussi que les effets de la RNase sur le RNA global des fragments anucléés sont plus complexes qu'on ne le pensait; il convient donc de demeurer prudent en ce qui concerne l'interprétation des expériences de Stich et Plaut.

Devançant un peu ce qui sera présenté en détails plus loin, il nous faut dire quelques mots des effets de l'*actinomycine* sur la régénération des deux types de fragments: l'*actinomycine*, on le sait, inhibe la synthèse des RNA, sans affecter les RNA préexistants. Si le schéma esquissé plus haut est correct, on doit prévoir qu'elle n'empêchera pas la formation de chapeaux par les fragments anucléés; elle ralentira et arrêtera finalement la régénération des fragments nucléés. C'est, effectivement, ce que nous avons observé (J. Brachet) et ce que Zetsche a confirmé dans le laboratoire de Hämmerling. Toutefois, lorsqu'on suit de près les effets de l'*actinomycine* sur la régénération des fragments anucléés, on constate que, si elle n'a aucun effet sur l'*initiation* des chapeaux, elle inhibe leur croissance ultérieure. L'*actinomycine* exerce donc des effets secondaires, qui n'étaient pas prévus par le schéma théorique.

Ces effets secondaires pourraient être dus à une toxicité banale de l'*actinomycine*; mais ils pourraient aussi résulter, comme nous l'avons suggéré, d'une combinaison de l'*actinomycine* avec du *DNA cytoplasmique*, probablement présent dans les chloroplastes. Afin de s'assurer de l'exactitude d'une telle explication, une étude du DNA dans les fragments anucléés et dans leurs chloroplastes a débuté. On en verra les résultats plus loin; disons tout de suite qu'ils sont compatibles avec l'idée que l'*actinomycine* peut se combiner à un DNA chloroplastique, capable de répllication en l'absence du noyau.

Terminons par une dernière considération d'ordre général: lorsqu'on compare les fragments anucléés des œufs d'oursin à ceux des *Acetabularia*, on est immédiatement frappé par les capacités morphogénétiques infiniment plus grandes des seconds. Tout ce qu'un œuf d'oursin peut faire, quand il a perdu son noyau, est de former des asters et de se fragmenter de manière anarchique; les fragments anucléés d'*Acetabularia*, on l'a vu, sont capables de former un chapeau qui ne le cède guère au point de vue de la morphologie et de la taille, à ceux des algues normales. Les fragments anucléés des deux organismes sont capables d'incorporer des acides aminés dans leurs protéines; mais l'existence d'une synthèse nette de protéines n'a été démontrée que chez les *Acetabularia*. Par contre, les moitiés anucléées des œufs d'oursin sont capables de synthèse appréciable de RNA (cf. plus haut); nous verrons que les fragments anucléés d'*Acetabularia* sont, au contraire, le siège d'une importante synthèse nette de certaines variétés de RNA. Nous pensons que ces différences entre l'œuf d'oursin et l'*Acetabularia* doivent tenir, essentiellement, à la présence de chloroplastes dans l'algue. Ces organites, d'après tout ce qui vient d'être dit, semblent jouir d'une très large indépendance vis-à-vis du noyau.

Après ces considérations générales, passons au résumé des faits expérimentaux.

## 5.2 — DNA (E. Baltus, M. Boloukhère, S. Bonotto, J. Brachet, F. de Vitry, V. Heilporn, M.S. Netrawali, D. Shephard et F. Vanderhaeghe)

Lorsqu'on s'efforce de déceler du DNA, dans une *Acetabularia*, par les procédés cytochimiques classiques (la réaction de Feulgen, par exemple), on est frappé de constater que le volumineux noyau de l'algue ne fournit jamais qu'une réaction négative (même si on centrifuge les algues, dans l'espoir de réunir en une masse unique les chromosomes qui seraient dispersés dans toute l'aire nucléaire). Ces réactions du DNA sont, cependant, positives dans les noyaux des gamètes et, dans les noyaux-fils, qui, issus de la rupture du gros noyau vont coloniser le chapeau pour former des cystes, puis des gamètes (J. Brachet, F. Vanderhaeghe). Ces observations, déjà anciennes, laissaient supposer qu'il ne se produirait pas, pendant toute la durée de la vie végétative de l'algue, de répllication du DNA: en d'autres termes, le gros noyau ne serait pas le siège de phénomènes d'endomitoses. Afin de vérifier cette conclusion, l'un de nous (J. Brachet) avait suivi, il y a quelques années déjà, l'incorporation de thymidine  $^3\text{H}$ , par autoradiographie, dans les

fragments nucléés et anucléés d'*Acetabularia* : conformément aux prévisions, le noyau n'était que faiblement marqué. Mais il fut constaté avec surprise qu'il se produit une incorporation de thymidine dans les chloroplastes, même dans le cas des fragments anucléés. Cette observation posait la question, dès ce moment, de la présence éventuelle de DNA dans les chloroplastes d'*Acetabularia* et de sa réplification possible en l'absence du noyau.

Le problème a été repris, par voie autoradiographique, par F. de Vitry et, de façon plus directe (isolement des chloroplastes et dosage du DNA) par E. Baltus et J. Brachet. Commençons par le travail de F. de Vitry : utilisant de la thymidine tritiée de haute radioactivité spécifique, elle a obtenu une incorporation importante de ce marqueur tant dans le noyau que dans le cytoplasme des *Acetabularia*. La radioactivité est, en partie, sensible à l'action de la DNase, le restant étant éliminé par la RNase. Il est à noter que la radioactivité due à la thymidine est distribuée de façon uniforme dans toute l'algue, alors que l'uridine (comme nous le verrons plus loin) s'incorpore d'abord dans le RNA nucléaire, pour s'accumuler ensuite à l'extrémité de la tige; il se dessine, dans celle-ci, un net gradient décroissant apico-basal.

Plus récemment, F. de Vitry a étudié la fixation d'actinomycine  $^{14}\text{C}$  dans les algues traitées *in vivo* par cette substance, pendant des temps allant de 1 heure à 4 jours. L'analyse autoradiographique a montré que la distribution est uniforme dans le noyau : le suc nucléaire et le nucléole sont également radioactifs. Le cytoplasme de la tige et, seulement, celui de la zone périnucléaire fixent rapidement l'actinomycine  $^{14}\text{C}$ . Cette fixation d'actinomycine  $^{14}\text{C}$  se produit aussi dans les fragments anucléés, ce qui indique, à nouveau, la présence probable de DNA dans leurs chloroplastes. Elle s'effectue même sur des chloroplastes isolés à partir de tiges anucléées. Dans le noyau et la zone périnucléaire, la radioactivité est sensible à la DNase et la RNase; mais dans les chloroplastes, les deux enzymes sont aussi efficaces l'un que l'autre. Nous retrouverons des faits analogues à propos de l'incorporation de l'uridine dans le RNA des chloroplastes; rappelons que nous avons déjà signalé un comportement semblable vis-à-vis des nucléases à propos du DNA cytoplasmique des œufs de Batraciens.

Les effets de divers *inhibiteurs de la synthèse du DNA* ont été étudiés : il s'agit, surtout, de la FUDR, du phényl-éthyl-alcool (PEA) (F. de Vitry) et, plus récemment, de l'hydroxyurée (J. Brachet). Leurs effets, sur la régénération des deux types de fragments, sont différents : alors que les fragments nucléés sont plus sensibles à la FUDR que les anucléés, c'est l'inverse qu'on observe dans le cas de l'hydroxyurée. Quant au PEA, il inhibe fortement, mais de façon incomplète la régénération (surtout celle des fragments anucléés). L'intérêt de cette substance réside surtout dans le fait qu'elle provoque de très nombreuses anomalies de la régénération (hétéromorphoses) : verticelles géants, chapeaux anormaux, tiges secondaires à proximité des rhizoïdes, etc. Les différences d'action, entre ces diverses substances, tiennent sans doute à ce qu'elles pourraient affecter inégalement la synthèse des diverses macromolécules : par exemple, si le PEA inhibe la synthèse du DNA, il stimule fortement celle du RNA dans les deux types de fragments (70 % à 200 %). La FUDR inhibe dans une égale mesure l'incorporation de la thymidine, tant dans les fragments nucléés que dans les anucléés. Elle diminue aussi l'incorporation de l'uridine dans le RNA; elle exerce des effets opposés sur la synthèse des protéines dans les deux types de fragments (inhibition dans les fragments anucléés, accumulation des acides aminés radioactifs dans les nucléés). Quant aux effets de l'hydroxyurée, ils n'ont encore été étudiés, sur le plan cytologique, que par des réactions cytochimiques : on peut conclure que cette substance provoque, de façon constante, une réduction du volume du noyau : c'est surtout le suc nucléaire (où baignent sans doute les chromosomes) qui devient de moins en moins abondant; tout comme pour le nucléole, qui tend à devenir sphérique, la basophilie (teneur en RNA) du suc nucléaire devient excessive.

Passons maintenant aux expériences biochimiques, où on a dosé la teneur en DNA des chloroplastes isolés (E. Baltus et J. Brachet). Les chloroplastes de fragments anucléés ont été isolés en gradients de densité, de grandes précautions étant prises pour éviter toute contamination bactérienne. Les dosages ont été effectués par la méthode fluorométrique, avec contrôle de spécificité au moyen de DNase. Les dosages ont montré que les chloroplastes, dans ce cas où toute

contamination par du DNA nucléaire était exclue, *contiennent effectivement de faibles quantités de DNA*. Le DNA chloroplastique ne représente guère que 1 % du DNA présent dans le chapeau au moment où celui-ci contient des milliers de noyaux. Des chiffres semblables ont été obtenus, au même moment, par Gibor et Izawa à l'Institut Rockefeller. Nous ne savons pas encore grand chose de ce DNA chloroplastique, dont nous nous proposons actuellement d'étudier à fond les propriétés; des expériences préliminaires de E. Baltus rendent très probable que le DNA du noyau et celui des chloroplastes sont *différents* l'un de l'autre : en effet, les cystes (qui contiennent à la fois des noyaux et des chloroplastes) donnent deux pics distincts à l'ultra-centrifugeuse analytique. Nous verrons plus loin qu'il y a des raisons de penser que le DNA chloroplastique pourrait être associé, en tout ou en partie, à du RNA.

Puisque les chloroplastes des fragments anucléés contiennent du DNA et puisque les expériences d'incorporation de thymidine indiquent que ce DNA pourrait se répliquer, une intéressante question se pose : *les chloroplastes peuvent-ils se multiplier en l'absence du noyau cellulaire?* Des comptages minutieux des chloroplastes ont été effectués, afin de répondre à cette question, par D. Shephard. La réponse est, sans aucun doute, *affirmative* : le nombre des chloroplastes augmente, mais de façon modérée, en l'absence du noyau. Leur multiplication est inhibée, dans les deux types de fragments, par l'obscurité; elle reprend à la lumière. Toutefois, la multiplication des chloroplastes est plus lente dans les fragments anucléés, où on observe de nombreuses formes en haltère et de taille excessive : il semble donc bien que les chloroplastes puissent réaliser, de façon autonome, la synthèse de tous leurs constituants en l'absence du noyau; mais un facteur d'origine nucléaire exercerait un effet favorable sur leur division (bipartition) ultérieure.

Si les chloroplastes incorporent de la thymidine dans du DNA et si leur nombre augmente en l'absence du noyau, on doit s'attendre à observer l'existence d'une *synthèse nette de DNA en l'absence du noyau cellulaire*. La réalité de cette situation apparemment paradoxale vient d'être démontrée par V. Heilporn et J. Brachet : la teneur en DNA des fragments anucléés *double* approximativement en une semaine. Cette synthèse de DNA se produit dans les chloroplastes : en effet, la teneur des fragments anucléés en DNA chloroplastique double aussi en une semaine. La synthèse de DNA ne se produit qu'à la lumière. La teneur en DNA des algues entières, au cours de leur croissance, est actuellement étudiée par V. Heilporn: si on la suit depuis le cyste jusqu'à l'algue adulte, on constate qu'elle évolue de façon exponentielle en fonction de la taille de l'algue et de façon linéaire en fonction de son poids sec. Si on compare la vitesse de synthèse dans les deux types de fragments, on constate qu'elle est initialement tout au moins, plus rapide dans les fragments *anucléés* que dans les autres. Des résultats analogues avaient déjà été obtenus, en ce qui concerne la synthèse des protéines, par J. Brachet et H. Chantrenne; ils s'expliquent probablement du fait que la régénération des fragments anucléés est, elle aussi, initialement plus rapide que celle des fragments nucléés. Tout se passe donc comme si l'enlèvement du noyau faisait disparaître certains mécanismes de contrôle, qui répriment normalement la synthèse des macromolécules et la morphogénèse.

Une étude des effets de divers *inhibiteurs* sur la synthèse du DNA a commencé : l'*hydroxyurée*, dont on a vu plus haut les effets sur la morphogénèse, inhibe la synthèse du DNA, de 50 % environ, que les algues soient nucléées ou non. Il semble donc bien que l'hydroxyurée, dont les effets sur la synthèse du DNA doivent encore être analysés de façon plus précise, agisse directement sur des facteurs cytoplasmiques (probablement, la répllication du DNA cytoplasmique), plutôt que sur un intermédiaire d'origine nucléaire (V. Heilporn et J. Brachet). D'autre part, les effets de deux agents alkylants (la méthyle-N-nitroso-N méthylguanidine et l'éthyle -méthanesulfonate) sont actuellement étudiés par V. Heilporn et S. Bonotto; nous savons, à l'heure actuelle, que le premier, bien qu'il soit fortement mutagène, n'inhibe, à l'inverse de l'hydroxyurée, que légèrement la synthèse du DNA; il semble qu'il puisse même parfois la stimuler. Le second, dont nous avons pu utiliser un dérivé tritié, pénètre aisément dans les algues intactes et dans les chloroplastes isolés : ses effets sur la synthèse du DNA chloroplastique mériteront certainement une étude sérieuse. Enfin, on se propose d'étudier la *radiosensibilité* du DNA chloroplastique (M.S. Netrawali,

S. Bonotto et V. Heilporn) : le problème est compliqué par la forte radiorésistance de l'algue, puisqu'il faut monter à 100 000 rad pour empêcher complètement la formation des chapeaux.

*Acetabularia*, comme les œufs des animaux, présente un très intéressant problème relatif à la *régulation* de la synthèse des deux types d'acides nucléiques : pendant une longue période de leur vie (croissance de l'algue et formation de son chapeau, oogénèse des animaux), les synthèses portent *exclusivement* sur les RNA. A un moment donné (lors de la fécondation, chez les œufs), les synthèses de RNA s'arrêtent et elles sont remplacées par une phase de réplication rapide du DNA; chez *Acetabularia*, ce moment se place lors de la dégénérescence du gros noyau végétatif. Dans les deux cas, ce sont probablement des facteurs *cytoplasmiques* qui contrôlent l'orientation que prennent les synthèses d'acides nucléiques; les raisons de le penser, dans le cas des œufs de Batraciens, ont été discutées plus haut. Chez *Acetabularia*, d'élégantes expériences de J. Hämmerling ont montré qu'il suffit de couper la tige de l'algue, de façon répétée, pour empêcher la dégénérescence du gros noyau végétatif et la formation des noyaux-fils : en d'autres termes, la réduction du volume du cytoplasme prolonge la période de synthèse du RNA et empêche la réplication du DNA de s'amorcer. Inversement, la greffe d'un chapeau « âgé » sur une tige jeune provoque la division du noyau : elle induit donc la réplication du DNA. Il entre dans nos intentions d'analyser ces expériences de Hämmerling sur le plan biochimique. Mais, avant de le faire, il était utile de se faire une idée de l'*ultrastructure du chapeau « âgé »*, en particulier celle des noyaux-fils et des chloroplastes. C'est à cette tâche que s'attaque M. Boloukhère, qui a dû surmonter un grand nombre de difficultés d'ordre technique. Les premières images obtenues montrent que, dans le chapeau, les chloroplastes sont polymorphes, certains d'entre eux étant nettement différents de ceux qu'on trouve dans la tige. Quant aux noyaux secondaires, ils sont entourés par une double membrane; ils ont un nucléole, mais de structure moins complexe que celui du noyau primaire.

### 5.3 — RNA

#### 5.3.1 Effets d'inhibiteurs de la synthèse de RNA (E. Baltus, M. Boloukhère, J. Brachet, F. de Vitry, A. Goffeau, D. Shephard, D. Simic, N. Six et P. Van Gansen)

Comme nous l'avons déjà signalé plus haut, l'*actinomycine* n'empêche pas l'initiation des chapeaux dans les fragments anucléés, mais elle inhibe leur croissance ultérieure (J. Brachet). Ces premières expériences ont été complétées par d'autres, visant à éprouver la valeur des idées qui ont été développées au début de ce chapitre : elles ont consisté, par exemple, à cultiver pendant un temps prolongé des algues jeunes (nucléées) en présence d'actinomycine, puis à les couper en deux : la régénération des fragments anucléés provenant de ces algues qui avaient été longuement prétraitées par l'actinomycine devient quasi nulle. Ce résultat était à prévoir : un tel prétraitement devrait empêcher la synthèse des m-RNA par le noyau et, par conséquent, leur accumulation à la pointe de la tige (où le chapeau devrait se former). Notons aussi qu'un traitement très prolongé des jeunes algues par l'actinomycine, suivi du « choc opératoire » que cause la section de l'algue, peut provoquer la dégénérescence complète du noyau (visible à l'examen microscopique). De telles algues, qui ont, en somme été énucléées par voie chimique, ne régénèrent évidemment pas. D'autres expériences ont consisté à couper en deux des algues qui possédaient déjà un petit chapeau et traiter les fragments anucléés par de l'actinomycine : elles ont confirmé que cette substance inhibe la croissance des chapeaux, qui ne forment pas de cystes. Signalons, enfin, que l'actinomycine et la ribonucléase, lorsqu'on les ajoute en mélange, exercent des effets additifs : dans ces conditions, la régénération des fragments anucléés est totalement et irréversiblement inhibée; l'inhibition est réversible dans le cas des fragments nucléés, dans les mêmes conditions expérimentales (J. Brachet).

Les effets de l'actinomycine sur le noyau ont été analysés, par voie *cytochimique* et *autoradiographique*, par J. Brachet et par F. de Vitry : l'actinomycine réduit le volume du noyau et provoque une chute de la teneur en RNA du nucléole. L'incorporation de l'uridine est fortement

inhibée dans le RNA du nucléole et du cytoplasme (qui provient probablement du nucléole). Comme dans les oocytes d'Echinodermes dont il a été question plus haut, l'incorporation de l'uridine dans le RNA du suc nucléaire est relativement résistante à l'actinomycine. Dans une autre série d'expériences, F. de Vitry a choisi la guanosine comme précurseur du RNA : l'actinomycine inhibe son incorporation tant dans le noyau qu'à la pointe de la tige (c'est-à-dire aux endroits-clés pour la morphogénèse). En ce qui concerne, enfin, l'incorporation des acides aminés, l'actinomycine semble être dépourvue d'effets dans le cas des fragments anucléés; mais elle inhibe fortement l'incorporation du tryptophane et de l'arginine dans le nucléole, sans affecter celle dans le cytoplasme des fragments nucléés.

L'analyse des effets de l'actinomycine a été étendue jusqu'au niveau de l'*ultrastructure* de l'algue par P. Van Gansen et M. Boloukhère. Après de longs tâtonnements d'ordre technique, l'*ultrastructure* des algues normales a, tout d'abord, été étudiée en détails. On en retiendra que les chloroplastes, formés de grains, se dégradent à mesure qu'ils se transforment en amyloplastés dans les rhizoïdes. Les ribosomes sont présents dans toute l'algue, soit sous la forme de grains libres, soit sous celle de rosettes (polysomes?). A l'extrémité apicale, on note la présence de nombreuses vésicules ergastoplasmiques. Le noyau est entouré par une membrane double, bourgeonnante, qui donne naissance à de nombreuses «émissions nucléaires». Le nucléole, enfin, est formé de trois couches : une zone claire au centre, une zone granuleuse intermédiaire et une couche réticulée à l'extérieur. Des filaments et des granules semblables à ceux qu'on trouve dans le nucléole sont disséminés dans le suc nucléaire.

Après traitement des algues entières par l'*actinomycine*, on assiste à une fragmentation du nucléole, dont la couche externe se pulvérise. Les chloroplastes sont également touchés : leurs lamelles constitutives perdent leur orientation parallèle. Cette altération de l'*ultrastructure* des chloroplastes cadre très bien avec ce qui a été dit plus haut à propos de la fixation de l'actinomycine radioactive par les algues entières et par les chloroplastes isolés.

Il convient de dire encore quelques mots à propos des effets de l'actinomycine sur la *synthèse de RNA* : comme nous le verrons plus en détails un peu plus loin, les fragments anucléés sont le siège d'une importante synthèse nette de RNA. L'effet de l'actinomycine sur la synthèse de RNA et sur l'incorporation d'adénine dans les fragments *nucléés* est bien celui auquel on pouvait s'attendre (forte inhibition du moment que les concentrations et les durées d'action sont suffisantes). Par contre, une surprise nous attendait dans le cas des fragments *anucléés* : nous nous attendions à une inhibition de la synthèse nette de RNA, pensant que l'actinomycine, en se combinant au DNA des chloroplastes, empêcherait la synthèse des RNA chloroplastiques. C'est, effectivement, ce que nous avons observé, sauf dans un cas particulier : c'est celui de la *partie basale* de la tige (qui est presque incapable de régénérer). Déjà des observations autoradiographiques de F. de Vitry avaient montré que cette région présente une résistance étonnante à l'actinomycine en ce qui concerne l'incorporation de la guanosine. La question a été reprise, avec des méthodes biochimiques, par E. Baltus, D. Simic et N. Six, qui ont travaillé sur de petits fragments basaux de la tige. Leurs dosages ont montré que, effectivement, la teneur en RNA de ces fragments ne change pas en présence d'actinomycine; au contraire, la teneur en RNA des fragments apicaux (ou des algues entières) diminue au cours du traitement à l'actinomycine. La raison d'être de ce comportement très particulier des petits fragments basaux nous échappe encore : il pourrait être dû à ce que c'est surtout dans cette région que les chloroplastes tendent à dégénérer et à se muer en amyloplastés; peut-être ceux-ci ne contiennent-ils plus de DNA. Une autre explication, qu'on ne peut rejeter *a priori*, serait celle de la présence d'un virus à RNA dans cette partie de l'algue.

Toujours dans le cadre des effets de l'actinomycine sur la synthèse des RNA, nous nous sommes demandés si elle exercerait des effets sur des *chloroplastes isolés* (A. Goffeau et J. Brachet). Une technique a été mise au point pour isoler des chloroplastes d'*Acetabularia*, dont la pureté a été contrôlée au microscope électronique. Ces chloroplastes isolés sont capables de réduire le ferricyanure à la lumière et de réaliser une phosphorylation cyclique. Chose plus importante, ils sont aussi capables d'incorporer de l'ATP<sup>14C</sup> en présence des 4 nucléoside-triphosphates;

le produit formé est détruit par la RNase et il s'agit donc bien de RNA. La réaction est inhibée quand les chloroplastes sont traités à l'actinomycine. Il faut en conclure que les chloroplastes d'*Acetabularia*, même s'ils proviennent de fragments anucléés, sont capables de synthétiser leur propre RNA; ils contiennent de la RNA polymérase et le DNA chloroplastique peut servir d'amorceur pour la synthèse du RNA chloroplastique. Des résultats identiques, conduisant aux mêmes conclusions, ont été obtenus depuis, en Allemagne, par H.G. Schweiger. En outre, les chloroplastes isolés sont le siège d'une très active synthèse de protéines lorsqu'on leur ajoute un mélange d'acides aminés radioactifs. Son intensité ne baisse pas même lorsque les chloroplastes ont été isolés à partir de fragments énucléés depuis une semaine. L'incorporation des acides aminés dans les protéines chloroplastiques est stimulée par la lumière et inhibée par le chloramphénicol et par la puromycine: il doit donc s'agir d'une authentique synthèse de protéines. Mais le fait le plus important est que cette synthèse est inhibée par l'actinomycine et qu'elle est donc, en dernière analyse, dirigée par le DNA chloroplastique. Il est désormais clair que les chloroplastes, tels des organismes symbiotiques, sont doués de continuité génétique, qu'ils jouissent d'une large autonomie vis-à-vis du noyau, puisqu'ils sont capables de se multiplier et de synthétiser leurs propres DNA, RNA et protéines en l'absence de celui-ci.

Les effets de divers autres inhibiteurs des synthèses de RNA — déjà étudiés sur les œufs de Batraciens — ont été examinés dans le cas de la régénération des fragments nucléés et anucléés d'*Acetabularia*: ce sont les histones, la polylysine et le lévorphanol (J. Brachet).

Les résultats, assez décevants dans l'ensemble, peuvent se résumer de la manière suivante: les histones, qui pénètrent sans doute mal dans les algues, tendent, aux concentrations faibles, à accélérer l'initiation des chapeaux; aux concentrations élevées, elles inhibent, à la fois, leur production et leur croissance. Ces effets se manifestent surtout dans le cas des fragments nucléés. En somme, ils se rapprochent — comme on pouvait le prévoir — de ceux de l'actinomycine; mais ils sont, incontestablement, moins frappants et moins constants. La polylysine, pas plus que les histones, n'exerce d'effet spécifique sur la régénération des deux types de fragments: même à haute concentration (50  $\mu\text{m}/\text{ml}$ ), l'inhibition n'est que partielle; elle se manifeste davantage sur les fragments nucléés que sur les autres. Les deux types de fragments finissent par former des chapeaux, mais leur croissance (comme dans le cas de l'actinomycine) est nettement ralentie par rapport aux témoins. Quant au lévorphanol, il est beaucoup plus toxique pour les *Acetabularia*, que pour les œufs de Batraciens: dès la concentration de  $10^{-4}\text{M}$ , la plupart des algues meurent en 3 à 4 jours. Les fragments anucléés, sont plus sensibles à la toxicité du lévorphanol que les nucléés. Ceux-ci présentent aussi une beaucoup meilleure réversibilité après report dans de l'eau de mer. Des fragments nucléés, traités pendant 6 jours au lévorphanol ( $10^{-4}\text{M}$ ), ont été étudiés cytologiquement: les grains d'amidon sont particulièrement volumineux et ils étouffent le cytoplasme basophile des rhizoïdes. Les noyaux sont petits et les nucléoles présentent des signes de dégénérescence (forte vacuolisation). Le suc nucléaire présente, au contraire, une basophilie excessive. Ces images sont compatibles avec l'idée que le lévorphanol affecterait, de façon préférentielle, la synthèse des r-RNA ou de leurs précurseurs nucléolaires.

Enfin, le mode d'action de la RNase (dont nous avons vu plus haut les effets sur la régénération des deux types de fragments) a été analysé, par des méthodes biochimiques, par N. Six et D. Simic. Les résultats obtenus (on s'attendait, évidemment, à observer une chute de la teneur en RNA des fragments traités) ont été inconstants et imprévus: dans la moitié des expériences, la RNase n'a exercé aucun effet sur la teneur en RNA des fragments anucléés; dans l'autre, on a observé une paradoxale stimulation de la synthèse du RNA global. La RNase ne dégrade donc pas, lorsqu'elle agit *in vivo*, les RNA préexistants et elle peut même provoquer une accumulation excessive de RNA dans les fragments anucléés. Mais on ne peut nullement exclure, dans l'état actuel de la question, que seuls les m-RNA soient dégradés et que les RNA qui s'accumulent soient anormaux. Les effets de la RNase sur les synthèses protéiques sont également étranges: allant de pair avec la synthèse accrue de RNA, l'incorporation de phénylalanine dans les protéines peut doubler après 4 à 6 jours de traitement (dans les deux types de fragments). Si on reporte les fragments traités dans de l'eau de mer, la situation revient rapidement à la normale dans les

fragments anucléés; mais la stimulation des synthèses protéiques se maintient, pendant au moins 4 jours, dans les fragments nucléés. L'explication la plus simple de ces curieux changements serait d'admettre que la RNase, agissant *in vivo*, provoque la synthèse de RNA anormaux et, par voie de conséquence, celle de protéines anormales. Mais une telle hypothèse reste encore à démontrer.

5.3.2 *Synthèse des RNA* (E. Baltus, M. Boloukhère, J. Brachet, M. Ceska, F. de Vitry, J.E. Edström, M. Janowski, J. Quertier, D. Shephard, R. Tencer et F. Vanderhaeghe)

L'idée que des RNA « informationnels » sont synthétisés dans le noyau et migrent, après avoir traversé tout le cytoplasme jusqu'à la pointe de la tige des *Acetabularia* est, en réalité, antérieure à la notion même de RNA messagers : elle a été basée, il y a une dizaine d'années, sur des observations autoradiographiques de J. Brachet et M. Olszewska, démontrant que l'uridine s'incorpore, en premier lieu, dans le RNA du noyau; après retour dans l'eau de mer, on peut suivre la migration de ce RNA vers la pointe de la tige, où il paraît se fixer sur un récepteur. Nous avons vu plus haut que cette partie de l'algue est la seule à posséder un ergastoplasme abondant, qui pourrait jouer le rôle de récepteur. Il est probable que ce qu'on observait, par autoradiographie, était la sortie du noyau de RNA hautement polymérisés (précurseurs des r-RNA) associés à des m-RNA. Mais l'autoradiographie ne nous donne guère d'informations sur la nature chimique des divers RNA et une analyse biochimique est, évidemment, indispensable pour aller plus loin. C'est cette analyse qui est encore en cours.

Disons tout de suite que nous avons pu confirmer, de façon répétée, les résultats que nous avons obtenus il y a quelques années (H. Naora et J. Brachet): il se produit une *synthèse nette* de RNA dans les fragments anucléés et il s'agit, essentiellement, d'une synthèse de RNA *chloroplastique*. Comme le DNA, le RNA global peut doubler en 5 jours dans les fragments anucléés (E. Baltus); dans les deux cas, le gros — sinon la totalité — de la synthèse se produit dans la fraction chloroplastique. Ces observations sont, évidemment, en excellent accord avec tout ce qui a été dit plus haut à propos de la multiplication autonome des chloroplastes et de la présence d'une RNA polymérase dans ces organites.

La *nature des RNA synthétisés* a été étudiée par des expériences de « pulses » de courte durée (15 mn à 6 h), en utilisant du  $^{32}\text{P}$  ou de l'uridine comme précurseur. D. Shephard s'est particulièrement intéressé aux chloroplastes des fragments nucléés et anucléés; utilisant l'uridine comme précurseur, il a observé une synthèse extrêmement rapide de RNA (m-RNA et RNA macromoléculaire d'origine nucléolaire?) dans les fragments nucléés, où un pic d'incorporation apparaît immédiatement. L'incorporation est plus lente et moins intense dans les fragments anucléés, où un pic net n'apparaît qu'au 2<sup>e</sup> jour. Quant aux *chloroplastes*, ils sont le siège d'une incorporation lente et constante : ils semblent bien être l'objet d'une *synthèse continue* de RNA, plutôt que d'un turnover.

D'autres expériences, commencées par M. Ceska et poursuivies par M. Janowski, ont eu pour but de séparer chromatographiquement les RNA marqués après un pulse bref. Le travail préliminaire de M. Ceska a montré que les *Acetabularia* contiennent au moins 4 RNA différents, séparables par fractionnement sur une colonne de phosphate de Ca. Ils se marqueraient d'autant plus lentement que leur poids moléculaire est plus élevé. L'énucléation a pour conséquence l'arrêt de la synthèse du RNA dont le poids moléculaire est le plus élevé (précurseur nucléolaire des r-RNA?). Les conditions techniques adoptées par M. Janowski étaient différentes (« pulses » très courts — 15 à 30 mn — au  $^{32}\text{P}$ , séparation des RNA sur colonnes d'albumine méthylée-kieselguhr (MAK). Il est parvenu ainsi à séparer, de façon très reproductible, *trois* RNA distincts, qui sont présents dans les deux types de fragments. L'un des pics (I) correspond aux chloroplastes, un autre (pic II) au liquide surnageant après centrifugation d'un homogénat d'*Acetabularia* à des vitesses modérées. Quant au troisième (pic III), il correspond à un acide nucléique qui se trouve

à la fois dans les chloroplastes et le surnageant. Chose curieuse, ses propriétés vis-à-vis de l'hydrolyse alcaline ou enzymatique (digestion par la DNase et la RNase) indiquent qu'il s'agit d'un RNA étroitement associé à du DNA. Il se pourrait qu'il s'agisse d'un hybride moléculaire DNA-RNA, ce qui expliquerait le comportement particulier de l'actinomycine radioactive qui s'est fixée sur les chloroplastes vis-à-vis des nucléases (cfr. plus haut). Dans les expériences de D. Shephard, dont il vient d'être fait mention, il a été observé aussi que la radioactivité des chloroplastes, après un « pulse » à l'uridine, est partiellement sensible à la DNase et qu'elle est extrêmement sensible à un mélange de DNase et de RNase.

La question des *ribosomes* et des r-RNA, chez *Acetabularia*, en particulier leur sort après l'enlèvement du noyau, a fait l'objet d'études continues au cours des 5 dernières années : en fait, tous les efforts tentés par E. Baltus, J. Quertier, F. Vanderhaeghe pour isoler une fraction ribosomale « propre » à partir des algues ont longtemps échoué. Les difficultés rencontrées tiennent certainement en partie au fait que les ribosomes, chez *Acetabularia*, sont relativement très peu abondants par rapport aux chloroplastes et aux membranes cellulaires. Une autre raison, qui n'a été mise en évidence que tout récemment par M. Janowski, est la teneur excessive de l'algue en  $Mg^{++}$  (l'homogénat des algues est 0,053 M en  $Mg^{++}$  et il doit être dilué 10 fois pour que les ribosomes agrégés ne précipitent pas au fond du tube, lors de l'ultracentrifugation en gradient de saccharose). Nous verrons plus loin quels sont les premiers résultats obtenus par cette nouvelle technique. Auparavant, il importe de prendre connaissance des résultats obtenus par E. Baltus et J. Quertier qui, renonçant à isoler les ribosomes, ont mis au point une excellente technique pour l'extraction au phénol et la caractérisation des RNA ribosomiaux. La composition en bases des r-RNA ainsi obtenus (on peut en préparer 70  $\mu g$  à partir de 400 algues) a été comparée à celle des r-RNA chloroplastiques, également isolés au phénol : les deux compositions se sont révélées être *totale*ment différentes. Alors que le RNA des ribosomes chloroplastiques montre la prépondérance habituelle de la guanine et de la cytosine ( $G + C = 55\%$ ), le RNA des « vrais » ribosomes (cytoplasmiques) a, chez *Acetabularia*, une composition en bases inusitée : il est exceptionnellement riche en uracile (38 %).

Ce fait curieux doit être rapproché d'autres observations faites au laboratoire sur la composition en bases de divers constituants de l'algue (R. Tencer, J. Edström, E. Baltus et J. Quertier) : utilisant l'utramicrométhode de Edström (en partie, avec l'aide de celui-ci) pour la détermination de la composition en bases des RNA, il a été constaté que le RNA du suc nucléaire se caractérise, lui aussi, par une richesse exceptionnelle en uracile. Une surprise nous attendait en ce qui concerne la composition en bases du RNA du nucléole : alors que celui-ci, de façon très générale, ressemble au r-RNA et est donc riche en  $G + C$ , le RNA du nucléole d'*Acetabularia* ressemble au DNA : les teneurs en G et C d'une part, en A et U d'autre part, sont égales. En outre, les pourcentages des purines (G et A) sont les mêmes dans le DNA et dans le RNA nucléaire d'*Acetabularia*. En somme, chez cette algue, c'est le RNA du suc nucléaire qui ressemble au r-RNA (des « vrais » ribosomes), tandis que le RNA du nucléole ressemble au DNA. Les raisons de cet étrange état de choses demeurent inconnues et les recherches visant à l'expliquer méritent, sans aucun doute, d'être poursuivies avec vigueur.

Revenant aux r-RNA des ribosomes cytoplasmiques, E. Baltus et J. Quertier ont pu montrer qu'ils forment, comme d'habitude, deux pics à l'ultracentrifugation (r-RNA lourd et léger). Ces pics tendent à être de dimensions équivalentes, alors que l'un des deux l'emporte nettement dans le cas des r-RNA chloroplastiques. A cet égard aussi, ces derniers se comportent donc de façon plus classique que les r-RNA des « vrais » ribosomes d'*Acetabularia*. Enfin, E. Baltus et J. Quertier ont étudié le sort des r-RNA des ribosomes cytoplasmiques après enlèvement du noyau : des expériences de marquage au  $^{32}P$  ont montré que leur *synthèse s'arrête* dans les fragments anucléés. En fait, les r-RNA eux-mêmes tendent à disparaître dans ces fragments : au 4<sup>e</sup> jour après l'énucléation, on constate que soit le pic du r-RNA lourd, soit les deux pics des r-RNA ont disparu; il arrive, toutefois, que les deux pics soient encore présents; mais ils sont alors déplacés vers les densités plus légères. Il ne semble pas exister de relation de cause à effet entre la régénération (formation d'un chapeau) et la disparition des r-RNA dans les fragments anucléés.

Des expériences actuellement en cours visent à établir si les pics de r-RNA peuvent se reconstituer, à la longue, dans des fragments *anucléés* : les premiers résultats semblent indiquer que les pics ne peuvent pas réapparaître lorsque tous les deux avaient disparu; mais le pic du r-RNA lourd, quand il avait disparu seul, peut parfois se reconstituer partiellement en deux semaines. Quelle que soit l'issue finale de ces expériences, on peut, dès maintenant, tirer une conclusion : c'est que les *RNA ribosomiaux se trouvent sous un contrôle nucléaire beaucoup plus étroit que les RNA chloroplastiques*. Une étude au microscope électronique des fragments *anucléés*, actuellement en cours, devrait permettre de l'affirmer avec plus de certitude. Rappelons que cette conclusion est en parfait accord avec tout ce que nous savons sur l'origine nucléaire des r-RNA.

Les recherches effectuées, en ce moment, par M. Janowski devraient jeter plus de lumière sur le sort des *ribosomes* et des *polysomes* dans les fragments *anucléés* de l'algue. Grâce à la technique nouvelle qu'il a mise au point, il lui est désormais possible d'isoler, de manière très reproductible, les *ribosomes* (et leurs sub-unités), les *polysomes* et les « *particules natives* » (formées de RNA de haut poids moléculaire associé à des protéines), qui sont les précurseurs probables des ribosomes. Une étude des constantes de sédimentation, des effets de la RNase et du marquage des diverses fractions par l'uridine<sup>3</sup>H, au cours de « *pulses* » courts, a conduit aux premières conclusions suivantes :

- 1) il est possible d'isoler, par ultracentrifugation en gradient de densité, des polysomes, que la RNase transforme rapidement en monosomes;
- 2) on observe deux pics de radioactivité, correspondant à des particules 48S et 65S respectivement : il pourrait s'agir de « *ribosomes natifs* ». Ces données ont été obtenues sur des algues entières; elles démontrent clairement que le noyau d'*Acetabularia* produit des m-RNA, qui unissent les ribosomes individuels en polysomes. Elles montrent aussi que, très probablement, le noyau de l'algue synthétise et émet dans le cytoplasme des particules qui seraient les précurseurs des monosomes. Mais que se passe-t-il dans les fragments *anucléés*? Les premiers résultats, parfaitement reproductibles du reste, de M. Janowski ne manquent pas de surprendre à première vue : les expériences indiquent, en effet, qu'il se formerait des polysomes (donc des m-RNA) *en l'absence du noyau*. En outre, le maintien des algues à l'obscurité, avant ou après l'énucléation, exerce des répercussions significatives sur l'incorporation de l'uridine dans les ribosomes 82S, les particules 65S et 48S, les RNA globaux et, surtout, les polysomes : la radioactivité incorporée dans cette fraction peut augmenter jusqu'à 25 fois lorsque des fragments *anucléés*, provenant d'algues qui avaient été cultivées à la lumière, sont maintenus pendant 2 jours à l'obscurité. Il serait prématuré de vouloir tirer des conclusions, ou même de faire des hypothèses; on peut, néanmoins, se demander si l'obscurité ne libérerait pas des m-RNA d'origine chloroplastique qui, en se combinant aux ribosomes cytoplasmiques, formeraient des polysomes.

Ces curieuses observations rendent, évidemment, nécessaire une étude de l'*ultrastructure* des algues et des fragments *anucléés* maintenus à l'obscurité. Cette étude a commencé, dans le cas des algues entières cultivées pendant une dizaine de jours à l'obscurité (M. Boloukhère). Ce qui frappe surtout, à l'heure actuelle, c'est que le suc nucléaire des algues maintenues à l'obscurité est beaucoup plus riche en granules ressemblant aux ribosomes que celui des témoins.

Nos observations sur les m-RNA et les r-RNA des *Acetabularia* sont, sans nul doute, très encourageantes; de nombreuses lacunes, qu'on s'efforcera de combler, subsistent néanmoins. Mais ces lacunes sont béantes dans le cas des t-RNA, qui n'ont pas encore été étudiés sérieusement; tout ce que nous savons, c'est qu'ils existent et que l'incorporation de la *5-méthylcytosine* dans les RNA est aussi intense dans les fragments *anucléés* que dans les nucléés (F. de Vitry). Ce précurseur s'incorpore selon une cinétique entièrement différente de celle de la cytidine (incorporation préférentielle dans le nucléole). Nous avons vu plus haut qu'il en va exactement de même dans les oocytes d'étoiles de mer; ces expériences indiquent que le cytoplasme pourrait intervenir lors de la synthèse des t-RNA de façon importante. Mais il importerait de reprendre toute la question avec les élégantes techniques de séparation des t-RNA dont on dispose maintenant.

La question en vaut la peine, puisque le contrôle de la synthèse des protéines (dont nous allons maintenant parler) devrait, en principe, s'opérer au niveau de la traduction dans un système anucléé.

#### 5.4 — Protéines (E. Baltus, M. Boloukhère, S. Bonotto, J. Brachet, F. de Vitry, A. Lievens et E. Triplett)

Nos connaissances sur les *synthèses de protéines*, chez *Acetabularia*, sont encore fort incomplètes : nous savons, comme on l'a déjà rappelé plus haut, qu'elles sont importantes en l'absence du noyau et que le cytoplasme anucléé est capable de synthétiser de nombreux enzymes. Il s'agit, en général, des enzymes intervenant dans le métabolisme glucidique et il se pourrait que leur localisation soit strictement chloroplastique. Nous verrons, un peu plus loin, ce qu'on sait de la synthèse de l'enzyme qui a été le mieux étudié, la *phosphatase acide*.

L'autoradiographie nous a appris aussi que certaines protéines ont un comportement semblable à celui du RNA : les précurseurs (acides aminés) s'accumulent, d'abord, dans le noyau, où certaines protéines seraient synthétisées; on les voit ensuite migrer vers l'extrémité apicale de la tige, où elles demeurent fixées. Les premières expériences, faites avec de la méthionine radioactive par M. Olszewska et J. Brachet (1961), ont été reprises et étendues par F. de Vitry à d'autres précurseurs. Il semble que le cas de la méthionine soit assez particulier et que l'incorporation de l'arginine, de la lysine, de la phénylalanine et du tryptophane se fasse de façon beaucoup plus homogène. Il semble que seules certaines protéines sont synthétisées dans le noyau et migrent dans le cytoplasme. Ces résultats sont en bon accord avec ceux de G. Werz, dans le laboratoire de J. Hämmerling, qui a montré, par des méthodes cytochimiques, que la pointe de l'algue contient, outre des RNA de haut poids moléculaire, des protéines basiques particulières. Il serait certainement intéressant d'essayer de les isoler et de les analyser, car il est permis de penser (comme on va le voir) qu'elles pourraient jouer un rôle dans la régulation de la morphogénèse.

Le gros du travail effectué au laboratoire, en ce qui concerne la synthèse des protéines chez *Acetabularia*, a porté sur les effets d'*inhibiteurs* de cette synthèse (puromycine, cycloheximide) sur la morphogénèse (J. Brachet). La *puromycine inhibe rapidement toute régénération*, qu'il s'agisse de fragments nucléés ou anucléés : la morphogénèse de l'algue, la formation d'un chapeau en particulier, exige donc l'intégrité des synthèses protéiques. L'effet de la puromycine est quasi irréversible dans le cas des fragments anucléés, presque toujours réversible dans le cas des moitiés nucléées. Mais il est curieux de constater que le report dans l'eau de mer des fragments nucléés traités à la puromycine est souvent suivi de l'apparition de nombreuses anomalies de la régénération (tiges bifurquées ou trifurquées, transformations de rhizoïdes en tiges, etc.). L'existence de ces hétéromorphoses (qui ne se rencontrent que rarement dans les cultures normales, où elles sont actuellement recueillies et étudiées en vue d'une éventuelle étude génétique par S. Bonotto, démontre que la morphogénèse, chez *Acetabularia*, est conditionnée par la synthèse ordonnée de certaines protéines spécifiques à l'extrémité de la tige.

D'autres expériences ont eu pour but d'établir, par une voie directe, si la *croissance du chapeau* requiert une synthèse de protéines (ce qui était nié par l'école de Hämmerling) : des fragments anucléés pourvus de petits chapeaux (1.5 à 2 mm de diamètre) ont été traités par la puromycine. On a constaté que la croissance des chapeaux, qui a été suivie par des mensurations à des intervalles réguliers, est très sensiblement inhibée. Toutefois, la puromycine (à l'inverse de l'actinomycine : cfr. plus haut) n'empêche pas la formation de cystes; ceux-ci étaient, toutefois, extrêmement anormaux et n'ont jamais germé. Signalons encore que si on traite des fragments nucléés et anucléés par un mélange d'actinomycine et de puromycine, on obtient des effets additifs : non seulement l'arrêt de la régénération est total, mais la réversibilité, après report des fragments nucléés dans de l'eau de mer, est particulièrement lente à se manifester (J. Brachet).

Les effets biochimiques de la puromycine ont été étudiés de plus près par F. de Vitry, qui a eu recours à l'autoradiographie : l'incorporation de la phénylalanine, après une importante stimulation initiale (le 1<sup>er</sup> jour), est inhibée dans les deux types de fragments. L'incorporation du tryptophane dans les protéines est, elle aussi, fortement inhibée par la puromycine. Par contre, celle de l'arginine est relativement résistante, quel que soit le type de fragment. Nous verrons plus loin que les mêmes faits se retrouvent dans d'autres cellules (racines d'oignon, notamment). La puromycine touche aussi les synthèses de RNA : l'incorporation de la guanosine, dans les deux types de fragments, est, en effet, inhibée.

Enfin, les effets de la puromycine sur l'*ultrastructure* de l'algue ont été étudiés, au microscope électronique, par M. Boloukhère. Les algues traitées subissent rapidement une plasmolyse, qui s'accompagne d'un développement anormal et excessif de tout l'appareil vacuolaire : toute l'algue est envahie par de nouvelles membranes, dont certaines sont sûrement d'origine golgienne. Ces altérations atteignent même les lamelles chloroplastiques et les membranes mitochondriales qui se mettent à bourgeonner. Par contre, la structure du noyau (celle du nucléole, en particulier) n'est que très peu altérée. Le fait que les membranes intracellulaires puissent se développer considérablement dans des conditions où la synthèse des protéines est, en principe, bloquée, ne manque pas d'intérêt : la question se pose, en effet, de savoir si la puromycine provoque l'apparition de nouvelles membranes ou le déplissement de celles qui préexistaient.

Récemment, J. Brachet a comparé les effets de la *cycloheximide* à ceux de la puromycine : aucune différence autre qu'une plus grande activité, à concentration égale, de la cycloheximide, n'a été observée entre les deux inhibiteurs. Dans les deux cas, l'arrêt de la régénération est réversible dans les fragments nucléés, irréversible dans les autres. L'effet irréversible des inhibiteurs des synthèses protéiques sur la régénération des fragments anucléés ne s'explique, d'ailleurs, pas aisément et ses causes mériteraient d'être recherchées : peut-être, en l'absence de synthèses protéiques, les RNA qui sont accumulés à la pointe de l'algue sont-ils altérés ou détruits, de telle sorte que la formation de polysomes deviendrait impossible.

Enfin, une étude biochimique des effets de la puromycine et d'un autre inhibiteur des synthèses protéiques, le *chloramphénicol*, a été entamée par S. Bonotto : tous deux inhibent l'incorporation des acides aminés (leucine et lysine) dans les protéines. Mais le chloramphénicol inhibe aussi celle de l'uridine dans le RNA. On verra plus loin les raisons pour lesquelles notre intérêt s'est porté vers le chloramphénicol (qui, aux concentrations bactériostatiques, n'exerce aucun effet sur la régénération des fragments d'*Acetabularia*).

Comme nous l'avons signalé plus haut, il serait important de pouvoir étudier la synthèse de *protéines spécifiques* dans les fragments nucléés et anucléés d'*Acetabularia*, afin de mieux comprendre le contrôle de leur synthèse. La question a été étudiée, dans le cas des *phosphatases acides*, par E. Triplett, A. Lievens et E. Baltus; des résultats semblables ont été obtenus simultanément dans d'autres laboratoires, notamment celui de H. Harris à Oxford. L'étude électrophorétique de ces enzymes permet de déceler la présence de 5 isozymes, dont 3 sont présents en quantités suffisantes pour être dosables. Leur localisation intracellulaire semble être différente, certains étant associés aux chloroplastes et d'autres aux microsomes. La section de l'algue en deux augmente fortement l'activité de deux des isozymes, même dans les fragments anucléés. Cette augmentation d'activité se prolonge pendant 4 jours au moins; puis l'activité reste sensiblement constante. La formation des chapeaux, qui coïncide avec une forte synthèse de protéines, s'accompagne d'une nouvelle augmentation importante de l'activité des 3 isozymes. Les conclusions les plus importantes à tirer de ces observations sont les suivantes : les isozymes peuvent se synthétiser en l'absence du noyau; mais leur évolution est différente dans les deux types de fragments. Le contrôle de la synthèse des diverses formes de la phosphatase acide dans le cytoplasme anucléé, n'est pas le même pour tous les isozymes. Ces différences pourraient tenir à une durée de vie inégale des m-RNA qui dirigent la synthèse des isozymes en l'absence du noyau; mais le fait que ceux d'entre eux qui présentent la plus grande augmentation d'activité dans les

fragments anucléés sont liés aux chloroplastes s'explique le plus aisément en faisant appel aux idées développées plus haut au sujet de ces organites (indépendance vis-à-vis du noyau, présence de DNA, de RNA polymérase, possibilité d'une synthèse de protéines dirigée par le DNA chloroplastique).

Afin d'obtenir des données plus précises sur les mécanismes qui contrôlent la synthèse des diverses formes de phosphatases acides, A. Lievens a entrepris une étude des effets de la *teneur en phosphate du milieu* sur l'activité des divers isozymes. On sait, en effet, que chez les bactéries, la phosphatase alcaline (qui est, malheureusement, très peu abondante chez *Acetabularia*) est un enzyme répressible, dont la synthèse diminue quand on enrichit le milieu en phosphate. Les expériences actuelles n'ont pas encore conduit à des résultats suffisamment clairs pour qu'on puisse conclure. Mais une série de faits intéressants apparaissent dès maintenant : la culture des algues dans un milieu sans phosphate provoque une *diminution* initiale (40-80 %) de l'activité phosphatasique totale. Cette activité globale remonte ensuite, pour atteindre la valeur initiale après 3 à 5 semaines, dans les fragments nucléés et les algues entières; elle ne remonte que lentement et faiblement dans les fragments anucléés : l'existence d'un contrôle du noyau sur cette reprise de l'activité phosphatasique est donc évidente. Le travail est, actuellement, poursuivi par l'étude électrophorétique des isozymes : il semble bien que, dans les fragments nucléés et les algues entières, ce soit un seul des trois isozymes (de motilité 1.04 cm/volt/sec) qui soit responsable des changements d'activité décrits plus haut. Dans les fragments anucléés, malgré la très forte diminution de l'activité phosphatasique globale, les 3 isozymes restent décelables. Lors de la culture dans de l'eau de mer sans phosphate, l'un des isozymes disparaît complètement des fragments anucléés; un autre diminue d'activité, tandis que le troisième augmente très légèrement d'activité. Ces recherches seront poursuivies et on étudiera, notamment, les effets des inhibiteurs classiques des synthèses d'acides nucléiques et de protéines, sur le comportement des phosphatases.

### 5.5 — Rythme photosynthétique (T. Vanden Driessche)

On sait, par de nombreuses expériences, que le rythme photosynthétique, chez *Acetabularia*, se maintient longtemps dans les fragments anucléés. Cette intéressante question fait l'objet d'une étude approfondie de T. Vanden Driessche, qui a analysé les effets de divers inhibiteurs sur le rythme. Elle s'est également intéressée aux changements de forme que subissent les chloroplastes lorsque les algues sont cultivées à la lumière ou à l'obscurité.

Une première série d'expériences a porté sur les effets de l'*actinomycine*, qui était particulièrement intéressante du fait qu'elle se combine aux chloroplastes des *Acetabularia* (cfr. plus haut). Après avoir vérifié que le noyau n'est nécessaire ni à l'établissement du rythme, ni à son maintien, T. Vanden Driessche a clairement établi que l'*actinomycine abolit*, de façon spectaculaire, le rythme de capacité photosynthétique dans les algues *entières*. Mais, chose remarquable, les fragments *anucléés* sont capables de maintenir, ou même de restaurer, ce rythme même s'ils sont traités à l'*actinomycine*. Ce résultat se retrouve, quelles que soient la taille du fragment anucléé et sa position (apicale ou basale) dans la tige. On peut en conclure que la sensibilité du rythme photopériodique à l'*actinomycine* est liée à la présence du *noyau*.

Au rythme photopériodique est étroitement lié, comme l'a montré T. Vanden Driessche, un *rythme dans la variation de forme* (allongée ou sphérique) des *chloroplastes*. Conformément aux résultats des expériences qui viennent d'être résumées, ce rythme est aboli par l'*actinomycine* dans les algues entières et dans les fragments nucléés, mais pas dans les fragments anucléés. Leurs chloroplastes, comme l'avait montré D. Shephard (cf. plus haut), sont plus grands que ceux des fragments nucléés; l'*actinomycine* réduit la taille des chloroplastes des fragments anucléés. Ce fait confirme à nouveau l'idée que l'*actinomycine* se combine aux chloroplastes, probablement à leur DNA. Les résultats montrent aussi que les deux rythmes (photosynthèse et variation de forme des chloroplastes) sont étroitement liés.

Alors que l'actinomycine abolit, en une quinzaine de jours, le rythme de capacité photosynthétique, la *ribonucléase* n'exerce pas d'effets directs sur le mécanisme de l'horloge biologique; elle stimule, toutefois, la restauration du rythme dans les fragments nucléés, mais elle ne l'influence pas dans les fragments anucléés.

Les effets de la *puromycine* sur le rythme photopériodique n'ont, malheureusement, pas pu être étudiés à fond, parce que cet inhibiteur des synthèses protéiques altère rapidement et profondément, la photosynthèse elle-même. Il en va de même pour la *cycloheximide*.

Le *chloramphénicol* semble plus prometteur : en effet, il abolit ou diminue fortement le rythme photosynthétique dans les algues entières et, probablement, dans les fragments anucléés. Mais, comme T. Vanden Driessche l'a montré en collaboration avec S. Bonotto (cf. plus haut), le chloramphénicol n'inhibe pas seulement la synthèse des protéines, mais aussi celle du RNA chez *Acetabularia*. On ne peut donc décider si le rythme dépend de la synthèse des protéines ou de celle du RNA (ou des deux).

Une autre observation intéressante, qui devra être analysée, est la suivante : l'ablation d'une partie de la tige, notamment de sa partie apicale, *stimule* le rythme. Cette stimulation est d'autant plus forte que le fragment de tige enlevé est plus grand.

## 6 — CELLULES DIFFERENCIÉES — DIVERS

(F. Bosseler, J. Brachet, L. Desai, A. Ficq, C. Gérard, V. Heilporn, N. Lacroix, S. Limbosch, A. Preumont, J. Quertier, E. Schram, D. Simic, N. Six, M. Steinert, R. Tencer, S. Van Assel).

### 6.1 — Mode de synthèse des histones (F. Bosseler, D. Simic, N. Six)

Le mode de synthèse des histones présente encore bien des côtés obscurs : ces protéines chromosomiales sont-elles synthétisées dans le noyau ou dans le cytoplasme? Dans la première éventualité, se forme-t-il un m-RNA spécifique dirigeant la synthèse des histones? Si oui, comment se fait-il que cette synthèse ne soit pas immédiatement réprimée, puisque les histones inhibent puissamment la RNA polymérase? Si la synthèse des histones se fait dans le cytoplasme, se produit-elle au niveau des polysomes? Dans ce cas, les histones migrent-elles du cytoplasme vers le noyau et viennent-elles se fixer, de façon correcte, sur un segment du DNA? Les réponses à ces nombreuses questions laissent encore beaucoup à désirer. Si la majorité des biochimistes semble favorable à l'hypothèse d'une synthèse nucléaire des histones, on trouve aussi, dans la littérature, des travaux (surtout cytochimiques) qui apportent un certain appui à l'idée d'une synthèse cytoplasmique, suivie d'une migration vers le noyau.

Nous avons essayé d'apporter une contribution à la question en comparant les effets d'inhibiteurs des synthèses protéiques sur l'incorporation relative des acides aminés basiques et «normaux» (monoamino-monocarboxyliques). Les inhibiteurs utilisés, jusqu'à présent, ont été la *ribonucléase* et la *puromycine* et les matériaux biologiques utilisés ont été les *racines d'oignon* et les *cellules de HeLa*. L'étude se fait en utilisant, de façon parallèle, les techniques biochimiques et autoradiographiques.

Le choix de la *RNase* et des *racines d'oignon* était justifié par l'expérience acquise précédemment dans le laboratoire : nous avons constaté que la *RNase* pénètre facilement dans ces racines et qu'elle y arrête rapidement la croissance et la synthèse des protéines (J. Brachet). Dans ces conditions, le RNA ribosomal n'est pas dégradé de façon mesurable; comme les m-RNA sont beaucoup plus sensibles à la *RNase* que les t-RNA, il était logique de supposer que l'arrêt de la synthèse des protéines était dû, en ligne principale, à la destruction des m-RNA et, par voie de conséquence, à la transformation des polysomes en monosomes. En faveur d'une telle hypothèse,

on peut ajouter le fait que l'addition de RNA de la levure (donc, non spécifique) restitue aux racines traitées par la RNase la capacité d'incorporer normalement un acide aminé, la glycine. Ces expériences ont été reprises par N. Six, qui a montré que cette réactivation (qui ne se produit pas après un simple lavage à l'eau des racines traitées par la RNase) n'est pas limitée à la glycine : on l'observe, aussi, dans le cas de la phénylalanine et de la leucine. Cette réactivation de l'incorporation des acides aminés est importante, mais momentanée. Il serait, sans nul doute, fort intéressant de reprendre ces essais en employant des polynucléotides de synthèse mieux définis que le RNA de la levure en ce qui concerne leur composition chimique et leur activité dans le système acellulaire de Nirenberg et Matthaei.

Les effets de la RNase sur l'incorporation de la lysine, de l'arginine, de la leucine et de la phénylalanine dans les protéines des racines d'oignon ont été étudiés par voie biochimique (N. Six et D. Simic) et par autoradiographie (F. Bosseler). Les résultats ont été concordants : dans les conditions où la RNase inhibe massivement l'incorporation de la phénylalanine et de la leucine, elle n'affecte presque pas celle de la lysine et de l'arginine. Il semble donc que la RNase n'inhibe guère la synthèse des protéines basiques dans des conditions où elle empêche celle des autres protéines. L'autoradiographie montre, toutefois, que les effets (modérés) de la RNase sur la synthèse des protéines basiques se produisent, au même degré, dans le noyau et le cytoplasme.

Dans une autre série d'expériences, ce sont les effets de la puromycine qui ont été étudiés, toujours sur des racines d'oignon. Les résultats ont été très semblables à ceux qui viennent d'être rapportés pour la RNase : l'inhibition de l'incorporation de la lysine était faible ou nulle, dans des conditions où celle de la phénylalanine était réduite de 50 %. La continuation et l'extension de ses expériences ont conduit F. Bosseler à la conclusion suivante : la puromycine bloque régulièrement l'incorporation nucléaire et cytoplasmique de la phénylalanine et de la leucine; mais ses effets, dans le cas des acides aminés basiques, sont beaucoup plus variables. Cette variabilité, qui rend incertaine l'interprétation des résultats, tient à la pénétration très variable de la puromycine dans les racines de divers oignons : ce fait a pu être établi au moyen de puromycine tritiée, aimablement mise à notre disposition par le Dr. Nathans.

C'est pourquoi F. Bosseler a, récemment, changé de matériel et travaille actuellement sur les cellules de *HeLa*; celles-ci se prêtent mieux à une analyse biochimique précise des résultats (possibilité d'isolement des noyaux et des diverses fractions d'histones, notamment). Toutes les techniques requises sont, maintenant, au point et de premiers résultats ont été obtenus : ils montrent que, comme dans les racines d'oignon, la puromycine inhibe davantage l'incorporation de la leucine que celle des acides aminés basiques (arginine) dans les protéines. Mais, chose curieuse et qui reste à vérifier, la cycloheximide paraît exercer des effets inverses (inhibition plus forte de l'incorporation d'arginine que de leucine).

De ces expériences encore incomplètes, on ne peut encore dégager qu'une impression : il est probable que la synthèse des histones se produit dans le noyau lui-même, plutôt qu'au niveau des polysomes cytoplasmiques. Cette impression est renforcée par une expérience préliminaire de P. Malpoix qui a été signalée plus haut : chez l'embryon de poulet, l'actinomycine (qui devrait agir en premier lieu sur le DNA chromosomal) bloque plus rapidement l'incorporation dans les protéines d'un acide aminé basique (la lysine) que celle de la valine.

## 6.2 — Chromosomes géants des larves de Diptères (L. Desai, A. Ficq, C. Gérard, N. Lacroix, R. Tencer)

On sait tout l'intérêt que les chromosomes géants (polytènes) des glandes salivaires des larves de Diptères (*Drosophila*, *Chironomus*, *Rhynchosciara*, etc.) présentent pour les cytogénéticiens et les cytochimistes : rappelons seulement leur structure où des bandes riches (sombres) et pauvres (claires) en DNA alternent et le fait que l'activation de certains gènes se traduit, au niveau de l'une des bandes sombres, par une synthèse brusque et importante de DNA, de RNA et

de protéines : il en résulte la formation d'un « puff », indice microscopiquement visible de la stimulation de l'activité d'un gène donné, à un stade bien précis du développement de la larve. Le traitement de celles-ci par une hormone, l'ecdysone, fait apparaître de nouveaux « puffs » ; toutefois, cette réponse des chromosomes à l'hormone n'est pas entièrement spécifique, puisque de nombreux agents (RNase, chocs thermiques, ions  $Zn^{++}$ , etc.) provoquent également l'apparition de « puffs » supplémentaires; leur distribution est, toutefois, moins constante et régulière que dans le cas de l'ecdysone.

Nous nous sommes intéressés à trois problèmes différents, en choisissant des chromosomes géants comme matériel d'étude :

- 1) Quels sont les effets des histones sur les synthèses (RNA et DNA) dans ces chromosomes?
- 2) Est-il possible de dénaturer, par chauffage, le DNA de ces chromosomes *in situ*?
- 3) Toutes les bandes se comportent-elles de manière identique vis-à-vis d'une hydrolyse acide ménagée ou de l'actinomycine?

#### 6.2.1 Action des histones sur les chromosomes géants de *Chironomus*

Nous avons vu plus haut les effets des histones sur la synthèse de RNA dans les oocytes des Echinodermes; il était intéressant de rechercher si, dans le cas de glandes salivaires traitées *in vitro* par des histones, la synthèse de RNA serait bloquée de façon préférentielle au niveau de certaines bandes. Ces expériences, qui ont été commencées par C. Gérard, sont actuellement poursuivies par L. Desai. Elles montrent que les *protéines basiques* (diverses fractions d'histones ont été essayées) et la *polylysine* inhibent fortement la synthèse du DNA (incorporation de thymidine) et du RNA (incorporation d'uridine) dans *toutes* les bandes des chromosomes géants; comme dans les œufs de Batraciens injectés d'histones (cfr. plus haut), l'effet des protéines basiques sur la synthèse des RNA est moins marqué pour le nucléole que pour les chromosomes. Sur le plan physiologique aussi; les histones ont exercé un effet intéressant : après injection, elles empêchent la formation de nouveaux « puffs » sous l'influence d'ecdysone (aimablement mise à notre disposition par le Prof. Karlson, de Munich).

Comme les histones sont, on le sait, très sensibles à l'action de la trypsine, L. Desai a micro-injecté cet enzyme dans les larves : il n'en a pas résulté la formation de nouveaux « puffs »; mais ceux qui existaient ont augmenté de taille et l'incorporation de l'uridine dans les chromosomes a augmenté.

#### 6.2.2 Dénaturation *in situ* du DNA

Cette série d'expériences a été réalisée par R. Tencer et N. Lacroix; leur but final, qui n'a pas encore été atteint, serait d'apporter une démonstration directe, visible sous le microscope, du rôle de l'organisateur nucléolaire dans la synthèse des r-RNA. Il s'agirait d'une confirmation, par autoradiographie, des faits observés récemment par Ritossa et Spiegelman, qui ont employé des techniques biochimiques et génétiques. Le projet serait de dénaturer le DNA des chromosomes géants des larves de drosophile par la chaleur, de leur ajouter du r-RNA de drosophile marqué au tritium et de déceler sa localisation par autoradiographie. Les premiers essais n'ont donné que des résultats négatifs; c'est pourquoi il a paru utile, avant de les reprendre, d'étudier de plus près les conditions optimales pour réaliser la *dénaturation thermique du DNA chromosomal in situ*.

Cette dénaturation peut être suivie facilement par la coloration de Unna : le DNA natif se colore en vert, le DNA dénaturé en rouge. L'examen de la fluorescence, après coloration à l'acridine orange, est un autre moyen pour l'étude de dénaturation du DNA. Ces expériences ont montré que certaines bandes, sur lesquelles nous aurons à revenir bientôt, se laissent dénaturer moins facilement que d'autres par la chaleur. La présence de cytoplasme ou un traitement par

la RNase (qui forme un complexe avec le DNA) protègent les chromosomes contre la dénaturation thermique. L'augmentation de la force ionique de la solution exerce aussi un effet inhibiteur sur la dénaturation *in situ* du DNA chromosomal. La renaturation du DNA s'effectue rapidement (en 4 h) à une température voisine de 70 °C; les bandes des chromosomes «renaturés» existent toujours, mais elles sont plus floues que normalement.

Dans le cadre des mêmes recherches, N. Lacroix et R. Tencer ont étudié aussi les effets de la *trypsine* sur la structure et la colorabilité des chromosomes géants de *Chironomus*. Sous l'influence de cet enzyme, la structure des chromosomes se désagrège progressivement et les acides nucléiques se répandent librement en dehors du contour des chromosomes. Lorsqu'on effectue une digestion ménagée par la trypsine, des bandes auxquelles il a été fait allusion plus haut, ce sont celles qui se laissent dénaturer moins facilement par la chaleur, qui résistent plus longtemps que les autres.

Afin de s'assurer de la généralité de ces observations, ces diverses expériences sont actuellement refaites sur des *cellules de HeLa* par R. Tencer. Ces essais ont confirmé que la RNase protège le DNA contre la dénaturation thermique; au contraire, un traitement par HCl 0.25 N (qui élimine, sans doute, les protéines basiques) diminue la stabilité du DNA vis-à-vis de la chaleur. Il est particulièrement intéressant de noter que, d'une manière générale, le DNA des noyaux en interphase est plus stable vis-à-vis de la dénaturation thermique que celui des chromosomes en mitose; cette différence tient probablement à une teneur plus élevée en protéines du noyau au repos.

### 6.2.3 — Coloration à l'actinomycine<sup>3</sup>H et réaction de Feulgen ménagée

On admet, généralement, que le DNA est identique dans tous les noyaux d'une même espèce, tant au point de vue qualitatif que quantitatif. Dès lors, les différences qui doivent certainement exister entre les noyaux des divers tissus tiennent probablement à la fermeté de la combinaison du DNA avec les protéines nucléaires qui seraient différentes dans les divers noyaux. Nous verrons, un peu plus bas, ce qu'il faut penser de cette hypothèse dans le cas des noyaux de divers tissus adultes; il était intéressant de la mettre à l'épreuve dans le cas des chromosomes géants : l'énergie avec laquelle le DNA est fixé aux protéines pourrait varier d'une bande à l'autre, peut-être en rapport avec l'activité génétique.

Deux méthodes ont été utilisées pour aborder la question : la «coloration» par l'actinomycine<sup>3</sup>H, suivie d'autoradiographie, à laquelle il a déjà été fait allusion et la réaction de Feulgen effectuée, de façon très douce, à la température du laboratoire (technique de Jordanov). Les deux techniques se prêtent à une analyse quantitative (comptage des grains pour la première, mesures cytophotométriques pour la seconde). On doit s'attendre, si le DNA est fixé de façon très ferme aux protéines nucléaires à observer une diminution de son affinité pour l'actinomycine et une résistance accrue à l'hydrolyse acide préalable à la réaction de Feulgen.

Voici les résultats obtenus, en ce qui concerne les chromosomes géants des larves de Diptères : chez *Rhynchosciara*, l'actinomycine<sup>3</sup>H tend à «colorer» les chromosomes de façon beaucoup plus uniforme que la réaction de Feulgen (A. Ficq). Ces observations sont favorables à l'idée, qui se répand de plus en plus, que les interbandes (bandes «claires») contiennent aussi du DNA. Certaines bandes fixent moins l'actinomycine que les autres : ce sont celles qui se colorent en vert franc à l'Unna et qui sont donc, selon toute vraisemblance, les plus pauvres en RNA. Chez *Chironomus* (N. Lacroix, L. Desai et R. Tencer), le marquage par l'actinomycine se fait, au contraire, par bandes; mais il devient homogène quand les chromosomes sont traités par la RNase. Il semble donc que les interbandes contiennent aussi du DNA, mais qu'il ne puisse réagir avec l'actinomycine qu'après enlèvement du RNA. Une dénaturation du DNA, par voie chimique, diminue l'intensité de la fixation de l'actinomycine et le marquage devient homogène. Quand les glandes sont traitées *in vivo* par la trypsine, la fixation d'actinomycine peut doubler ou même tripler. Elle diminue, au contraire, lorsque les glandes ont été traitées, toujours *in vivo*, par les histones : il semble donc exister, comme on pouvait s'y attendre, une compétition entre les histones et l'actinomycine.

Enfin, L. Desai a commencé une étude cinétique de la réaction de Feulgen, en utilisant soit des concentrations faibles en HCl (0.1 N), soit des températures d'hydrolyse basses (20°). Les expériences montrent, dès maintenant, que les diverses bandes ne se comportent pas de la même façon : certaines se colorent au Feulgen alors que d'autres ne le font pas encore. A nouveau, ce sont les bandes qui résistent le mieux à la dénaturation thermique qui présentent cette cinétique particulière.

Il serait prématuré de vouloir conclure, mais il semble que ces recherches sont suffisamment prometteuses pour que leur continuation se justifie.

### 6.3 — Fixation d'actinomycine et cinétique de la réaction de Feulgen dans les noyaux de cellules différenciées (J. Brachet, A.M. Preumont)

Si les idées qui viennent d'être développées sont correctes, on devrait s'attendre à voir tous les noyaux se comporter de façon identique, en ce qui concerne l'affinité pour l'actinomycine et la résistance à l'hydrolyse acide, aux stades jeunes du développement embryonnaire; des différences dans le comportement des divers noyaux devraient apparaître au moment où se produit la différenciation cellulaire. C'est cette hypothèse que nous nous proposons de soumettre à une vérification expérimentale.

Il s'agit d'un travail de longue haleine, qui exige de très nombreuses mesures; celles-ci vont devenir possibles dans un avenir proche, l'U.L.B. venant d'acquérir un microdensitomètre de Deeley (qui sera déposé dans notre laboratoire), appareil qui permet d'effectuer des mesures de la densité optique d'un noyau en quelques secondes. Les résultats obtenus jusqu'à présent sont suffisamment encourageants pour que le travail soit poursuivi. Par exemple, l'allure des courbes obtenues suggère la présence, au stade neurula, de plusieurs DNA inégalement acidolabiles. Dans le foie du Xénope adulte, le DNA des noyaux des cellules lymphoïdes résiste infiniment mieux à l'hydrolyse acide que celui des cellules parenchymateuses et des globules rouges. Des différences significatives ont été observées lorsque le rapport  $\frac{\text{actinomycine fixée}}{\text{D.O. Feulgen}}$  a été déterminé dans divers tissus de Batraciens adultes.

### 6.4 — DNA kinétoplastique chez les Trypanosomidés (M. Steinert, S. Van Assel)

La présence de DNA, dans le kinétoplaste des Trypanosomidés, avait été démontrée par M. Steinert, par des réactions cytochimiques, avant son retour du Congo. Il avait établi aussi, par autoradiographie, que la réplication du kinétoplaste débute en même temps que celle du noyau. Toutefois, le kinétoplaste, à l'inverse du noyau, ne contient pas d'histones. Enfin, une étude au microscope électronique avait permis à M. Steinert de démontrer l'existence de liens étroits entre le kinétoplaste et le chondriome.

Ce sont ces recherches qui ont été poursuivies, à Bruxelles, par M. Steinert, avec l'assistance de S. Van Assel. Tout d'abord, il a été possible d'extraire au phénol le DNA de *Trypanosoma mega* et de l'examiner à l'ultracentrifugeuse analytique : on observe *deux pics distincts*, ce qui montre que le DNA du noyau et celui du kinétoplaste ont des compositions en bases différentes. Un traitement des trypanosomes par l'acriflavine fait disparaître leur kinétoplaste; ce même traitement fait aussi disparaître l'un des deux pics de DNA; c'est donc lui qui correspond au DNA kinétoplastique. Celui-ci représenterait 10 % du DNA total, si on se base sur les enregistrements obtenus à l'ultracentrifugeuse analytique; on trouve une valeur plus élevée (30 % du DNA total) par un comptage des grains après incorporation de thymidine <sup>3</sup>H. Cette différence pourrait tenir à un rendement incomplet lors de l'extraction au phénol du DNA kinétoplastique.

La réplication des deux DNA (nucléaire et kinétoplastique) a été analysée de plus près par autoradiographie : on peut conclure de cette étude, que la réplication du noyau ne se termine, généralement, pas en même temps que celle du kinétoplaste; chacun de ces deux organites a une chance égale de terminer sa réplication en dernier lieu. C'est la fin de la réplication de l'organite qui achève sa division en dernier lieu qui donne le signal de la division de l'organisme.

D'autre part, les effets de l'*acriflavine* sur le kinétoplaste ont été examinés très soigneusement : M. Steinert et S. Van Assel ont pu montrer que l'*acriflavine* inhibe de façon quasi immédiate l'incorporation de la thymidine dans le kinétoplaste; celui-ci, qui ne se réplique plus, est partagé au hasard dans les cellules filles : déjà après deux divisions, certaines de celles-ci n'ont plus de kinétoplaste microscopiquement visible. L'*acriflavine* n'agit pas sur des cultures en phase stationnaire ou carencées en hémine : la disparition du kinétoplaste est donc liée à la multiplication du Trypanosome. La microscopie électronique montre que la structure du kinétoplaste ressemble à celle d'un noyau bactérien; les fibres de DNA qu'il renferme normalement disparaissent, en tout ou en partie, après traitement à l'*acriflavine*. Enfin, la viabilité des trypanosomes à kinétoplaste réduit a été étudiée par étalement des cellules sur plaque de milieu gélosé : si le traitement à l'*acriflavine* est arrêté après la première division, un kinétoplaste de taille normale se régénère. Si ce traitement est prolongé jusqu'à la deuxième division, le kinétoplaste est perdu irréversiblement. Tout se passe donc comme s'il existait, dans chaque kinétoplaste, deux « templates » servant à la réplication.

#### 6.5 — Mode d'action du mercaptoéthanol (V. Heilporn, S. Limbosch, J. Quertier)

Des expériences antérieures ont montré que le mercaptoéthanol exerce de puissants effets morphostatiques sur les systèmes biologiques les plus variés (J. Brachet) : qu'il s'agisse de développement embryonnaire ou de régénération, le mercaptoéthanol produit un blocage rapide. L'analyse autoradiographique des résultats (V. Heilporn, S. Limbosch, J. Quertier) avait conduit à l'idée que, en présence de mercaptoéthanol, il se synthétiserait des RNA anormaux et, par conséquent, des protéines anormales.

Une base plus concrète a pu être donnée à cette hypothèse par des expériences récentes de V. Heilporn, S. Limbosch et J. Quertier : elles montrent que si on traite des cellules de HeLa vivantes par du mercaptoéthanol, il se produit une diminution importante (50 %) de la *méthylation des t-RNA* (à partir de méthionine); la méthylation des r-RNA est touchée aussi, mais dans une moindre mesure. Un appauvrissement des t-RNA en bases méthylées pourrait, évidemment, conduire à des erreurs lors de la lecture du message génétique.

#### 6.6 — Etude de la synthèse et de la spécificité des protéines ribosomiales (E. Schram)

Ces expériences ont visé à mieux définir les protéines présentes dans les ribosomes et leurs sub-unités. L'objectif lointain est d'étudier le rôle éventuel de ces protéines dans la différenciation cellulaire. Pour l'instant, il a paru plus sage de travailler sur un système simple et bien connu : les ribosomes de *E. coli*, qu'il est possible de préparer (ainsi que leurs sub-unités) au moyen de la centrifugeuse « zonale », dont E. Schram a appris le maniement aux Etats Unis. Les expériences ont, surtout, consisté à suivre la radioactivité des protéines des sub-unités 50S et 30S au cours de « pulses » au soufre 35, suivis de « chasses ». Elles ont permis de conclure à l'absence d'équilibre dynamique entre la totalité des particules 50S : ou bien, elles sont hétérogènes; ou bien, elles se trouvent à un stade variable de leur maturation. La distribution de la radioactivité, entre les différentes protéines des ribosomes s'est avérée fort différente avant et après le « chasing » : il faut en conclure qu'il se produit soit un échange sélectif de certaines protéines, soit la formation de ribosomes différents de ceux qui préexistaient.

## 6.7 — Divers

Un grand nombre de recherches et d'essais techniques ont été effectués au laboratoire, au cours des cinq dernières années. Ces travaux ne se situant pas dans la ligne générale des recherches du laboratoire, ou n'ayant eu qu'un caractère épisodique, nous ne ferons que mentionner leurs sujets, sans les analyser en détails. Il s'agit, le plus souvent, de travaux effectués par des chercheurs étrangers, qui ont désiré poursuivre à Bruxelles leurs travaux antérieurs. Dans d'autres cas, il s'agit des mémoires d'étudiants de licence ou de recherches qui n'en sont qu'à leurs débuts.

Voici un bref énoncé de ces sujets de recherches :

- 1 — Etude des effets de la cortisone et de la régénération sur la synthèse des divers types de RNA dans le foie de rat (J. Guzek, M. Moolenburgh, J. Robert).
- 2 — Etude de la pénétration de macromolécules (DNA, RNA) dans les *Acetabularia* (S. Bonotto).
- 3 — Etude (avec résultats négatifs) des effets de la DNase acide sur le DNA mitochondrial (M. David).
- 4 — Etude des effets de la puromycine sur la régénération des planaires et des têtards (P. Dereume).
- 5 — Assistance à des chercheurs d'autres laboratoires pour des travaux de microscopie électronique (pureté de préparations biologiques, notamment) (G. Steinert et P. Van Gansen).
- 6 — Recherche de conditions optimales pour la culture d'*Acetabularia* (L. Lateur).
- 7 — Mise au point de techniques biophysiques délicates (ultracentrifugation analytique, analyse automatique d'acides aminés radioactifs, électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ultramicro-électrophorèse, etc.) (E. Schram, R. Lombaert, R. Tencer).

## 7 — PUBLICATIONS

- Brachet, J. Morphogenetic effects of lipoic acid on amphibian embryos. *Nature* **189**, 156-157 (1961).
- Sells, B.H., Six, N., Brachet, J. The influence of the nucleus upon adenosine triphosphatase activity in *amoeba proteus*. *Exptl. Cell Res.* **22**, 246-256 (1961).
- Straus, W. Cytochemical observations on the transport of intravenously injected horseradish peroxidase and the development of phagosomes in the cells of the kidney of the rat. *Exptl. Cell Res.* **22**, 282-291 (1961).
- Olszewska, M.J., Brachet, J. Incorporation de la dl-méthionine <sup>35</sup>S dans les fragments nucléés et anucléés d'*Acetabularia mediterranea*. *Exptl. Cell Res.* **22**, 370-380 (1961).
- Geuskens, M. Etude autoradiographique de l'effet des inhibiteurs métaboliques sur les relations entre le noyau et le cytoplasme des oocytes d'astéries et de grenouilles. *Arch. Biol.* **72** (1) 153-171 (1961).
- Tencer, R. Incorporation of tritium-labelled thymidine in *Bufo* ♀ x *Rana temporaria* ♂ hybrid embryos. *Nature* **190** (4770) 100-101 (1961).
- Tencer, R. The effect of 5-fluorodeoxyuridine on amphibian embryos. *Exptl. Cell Res.* **23**, 418-419 (1961).
- Ficq, A. Localization of different types of ribonucleic acids (RNA's) in amphibian oocytes. *Exptl. Cell Res.* **23**, 427-429 (1961).

- Ficq, A., Pavan, C. Métabolisme des acides nucléiques et des protéines dans les chromosomes géants. *Pathol. Biol.* **9**, p. 756 (1961).
- Ficq, A. Contribution à l'étude du métabolisme cellulaire au moyen de la méthode autoradiographique. Monographie n° 9. Institut Interuniversitaire des Sciences nucléaires 121 pp. (1961).
- Olszewska, M.J. Recherches autoradiographiques sur la formation du phragmoplaste. *Protoplasma* **53** (3) 387-396 (1961).
- Olszewska, M.J. L'effet du  $\beta$ -mercaptoéthanol et de l'urée sur la structure du phragmoplaste. *Protoplasma* **53** (3) 397-404 (1961).
- Antoine, A. Influence de l'extrait à l'eau bouillante de souches de levures résistantes aux ions cuivriques sur le comportement de cellules parentales sensibles. *Arch. intern. Physiol. Bioch.* **69** p. 93 (1961).
- Decroly, M., Six, N., Cape, M. Etude des effets biochimiques du mercaptoéthanol. *Arch. intern. Physiol. Bioch.* **69** (3) p. 381 (1961).
- Descotils-Heernu, F., Quertier, J., Brachet, J. Quelques effets du  $\beta$ -mercaptoéthanol et du dithiodiglycol sur la régénération. *Developmental Biol.* **3**, 277-296 (1961).
- Limbosch-Rolin, S., Brachet, J. Etudes des effets du mercaptoéthanol et du dithiodiglycol sur la division cellulaire chez les œufs d'Amphibiens. *Exptl. Cell Res.* **24**, 120-130 (1961).
- Olszewska, M., de Vitry, F., Brachet, J. Influence d'irradiations UV localisées sur l'incorporation de l'adénine-8- $^{14}\text{C}$ , de l'uridine- $^3\text{H}$  et de la dl-méthionine- $^{35}\text{S}$  dans l'algue *Acetabularia mediterranea*. *Exptl. Cell Res.* **24**, 58-63 (1961).
- Brachet, J. Il ruolo dei gruppi sulfidrilici nella divisione cellulare e nella morfogenesi. *Minerva medica* **52** (46) 2091-2099 (1961).
- Brachet, J., Cape, M., Decroly, M., Six, N. Quelques effets biochimiques du  $\beta$ -mercaptoéthanol sur le foie de souris et de rat. *Biochim. biophys. Acta* **51**, 347-356 (1961).
- Brachet, J. The role of ribonucleic acid and sulfhydryl groups in morphogenesis. Extract "Growth in living systems" *Proc. intern. Symp. on Growth Purdue University* 244-275 (1961).
- Brachet, J., Cape, M., Decroly, M., Quertier, J., Six, N. Etude des effets biochimiques du  $\beta$ -mercaptoéthanol sur les œufs de Batraciens. *Developmental Biol.* **3**, 424-443 (1961).
- Ficq, A., Pavan, C. Métabolisme des acides nucléiques et des protéines dans les chromosomes géants. *Pathol.-Biol.* **9** (7,8) 756-757 (1961).
- Brachet, J. Le rôle du noyau cellulaire dans les synthèses. *Handb. der Pflanzenphysiologie* **14**, 206-219 (1961).
- Brachet, J. The Living Cell. *Scientific American* **205** (3) 51-62 (1961).
- Brachet, J. Nucleocytoplasmic interactions in unicellular organisms. *The Cell* **2**, 771-841 (1961).
- Brachet, J., Decroly, M., Six, N. Contribution à l'étude des effets biochimiques du mercaptoéthanol. *Arch. intern. Physiol. Biochim.* **69** (5) p. 743 (1961).
- Preumont, A.M., Baltus, E., Schram, E. Analyse des protéines nucléolaires. *Arch. intern. Physiol. Biochim.* **69** (5) p. 754 (1961).
- Brachet, J. Effects of  $\beta$ -mercaptoethanol and lipoic acid on Morphogenesis. *Nature* **193** (4810) pp. 87-88 (1962).
- Ficq, A. Métabolisme de l'oogénèse chez les amphibiens. «Symposium on germ cells and development» 121-140. Institut intern. d'Embryologie et Fondazione A. Baselli (1961).

- Altorefer, N. Contribution à l'étude de l'effet de position. *Ann. Biol.* **37**, 7-8 (1961).
- de Vitry, F. Etude de l'action de la 5-fluorodeoxyuridine sur la croissance et la morphogénèse d'*Acetabularia mediterranea*. *Exptl. Cell Res.* **25**, 697-699 (1961).
- Baltus, E. Etude de la ribonucléase des nucléoles isolés à partir d'oocytes d'Astéries (*Asterias rubens*). *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 82-87 (1962).
- Baltus, E. Dosage de l'acide désoxyribonucléique dans les œufs de Batraciens. *Arch. intern. Physiol. Biochim.* **70** (1) p. 142 (1962).
- Brachet, J. Les acides désoxyribonucléiques (ADN) et l'information génétique. « *Arch. der Julius Klaus-Stiftung für Vererbungsforschung, Sozialanthropologie und Rassenhygiene* ». **36**, 146-149 (1961).
- Schram, E., Lombaert, R. Determination of tritium and carbon-14 in aqueous solution with Anthracene powder. *Analytical Biochemistry* **3**, 68-74 (1962).
- Schram, A., Brachet, J. Differential effects of  $\beta$ -mercaptoéthanol and reduced glutathione on protein synthesis in a partially purified system. *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 596-598 (1962).
- Quertier, J. Etude autoradiographique du métabolisme des acides nucléiques et des protéines chez des neurulas de Batraciens traitées au  $\beta$ -mercaptoéthanol. *Acta Embryol. Morphol. Exper.* **5**, 57-70 (1962).
- Pohl, V., Brachet, J. Etude du rôle des groupes sulfhydriles dans la morphogénèse de l'embryon de poulet. *Developmental Biol.* **4** (3) 549-568 (1962).
- Vanderhaeghe-Hougardy, F., Baltus, E. Effet de l'énucléation sur le maintien de la phosphatase acide dans le cytoplasme de *Acetabularia mediterranea*. *Arch. intern. Physiol. Bioch.* **70** (1) p. 414 (1962).
- Ficq, A. Etude autoradiographique de l'incorporation de la 5-méthylcytosine-<sup>3</sup>H dans les oocytes d'astéries en croissance. *Arch. intern. Physiol. Biochim.* **70** (1) p. 402 (1962).
- de Vitry, F. Action de métabolites et antimétabolites sur la croissance et la morphogénèse d'*Acetabularia mediterranea*. *Protoplasma* **55** (2) 313-319 (1962).
- Brachet, J., Bieliavsky, N., Tencer, R. Nouvelles observations et hypothèses sur la létalité chez les hybrides. *Acad. roy. de Belg.* **48** (3) 255-277 (1962).
- Ficq, A. Le métabolisme de l'oogénèse étudié par autoradiographie. *Acad. roy. de Belg.* **48**, 335-343 (1962).
- Baltus, E., Brachet, J. Le dosage de l'acide désoxyribonucléique dans les œufs de Batraciens. *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 157-163 (1962).
- Brachet, J., Miraux-Jonckheere, A. Les effets du  $\beta$ -mercaptoéthanol sur l'incorporation des précurseurs des protéines et des acides nucléiques dans le foie et l'intestin de souris. *Exptl. Cell Research* **27**, 539-547 (1962).
- Brachet, J. Nucleic acids in Development. *J. of Cell. Compar. Physiol.* **60** (2) 1-18 (1962).
- Brachet, J. The role of sulfhydryl groups in morphogenesis. 13. Mosbacher colloquium, 21-41 Springer Verlag, Berlin (1962).
- Ficq, A. Localisation d'un acide ribonucléique (RNA) de transfert dans les oocytes d'Astéries. *Exptl. Cell Res.* **20**, 543-548 (1962).

- Roller, A. Etude de l'acide désoxyribonucléique des œufs de Batraciens. Arch. intern. Physiol. Bioch. **71** (1) 139 (1963).
- Decroly, M., Cape, M., Brachet, J. Contribution à l'étude du métabolisme de l'acide ribonucléique au cours du développement embryonnaire. Arch. intern. Physiol. Bioch. **71** (1) p. 129 (1963).
- Ficq, A., Aiello, F., Scarano, E. Métabolisme des acides nucléiques dans l'œuf d'oursin en développement. Etude autoradiographique. Exptl. Cell Res. **29**, 128-136 (1963).
- Limbosch-Rolin, S. Les effets du  $\beta$ -mercaptoéthanol et du dithiodiglycol sur la croissance de *Escherichia coli* et de *Saccharomyces cerevisiae*. Exptl. Cell Res. **29**, 61-72 (1963).
- Brachet, J. Le rôle biochimique du noyau cellulaire. Scientia 6<sup>e</sup> série, 1-5 (1963).
- Malpoix, P., Quertier, J., Brachet, J. The effects of  $\beta$ -mercaptoethanol on the morphogenetic movements of amphibian embryos. J. Embryol. exp. Morph. **11**, 155-166 (1963).
- Pohl, V., Quertier, J. Groupes sulfhydriles et morphogénèse. IV. Effets du  $\beta$ -mercaptoéthanol et de l'acide lipoïque sur le métabolisme des acides nucléiques chez les embryons de Batracien et de Poulet. J. Embryol. exp. Morphol. **11**, 293-305 (1963).
- Brachet, J., Decroly, M., Quertier, J. (collab.) Groupes sulfhydriles et morphogénèse. III. Etude biochimique des effets du mercaptoéthanol sur les embryons de Batraciens et l'algue *Acetabularia mediterranea*. Developmental Biol. **6**, 113-131 (1963).
- Brachet, J., Denis, H. Effects of actinomycin D on morphogenesis. Nature **198**, 205-206 (1963).
- Geuskens, M. Accumulation nucléolaire d'acide ribonucléique (RNA) dans l'oocyte d'Astérie. Exptl. Cell Res. **30**, 322-330 (1963).
- Brachet, J. Groupes sulfhydriles et morphogénèse. I. Effets du  $\beta$ -mercaptoéthanol, de l'acide  $\alpha$ -lipoïque, de l'acide adénosinetriphosphorique et de l'oxaloacétate sur le développement embryonnaire des Batraciens. Developmental Biol. **7**, 348-364 (1963).
- Pohl, V., Quertier, J. Effets de l'acide lipoïque oxydé sur la synthèse de l'acide désoxyribonucléique chez les embryons de Batraciens et de Poulet. Biochim. biophys. Acta **68**, 651-653 (1963).
- Denis, H. Effet de l'actinomycine sur la différenciation nerveuse de l'ectoblaste chez les embryons d'Amphibien. Exptl. Cell Res. **30**, 613-615 (1963).
- Brachet, J. The role of the nucleic acids in the processes of induction regulation and differentiation in the amphibian embryo and the unicellular alga *Acetabularia mediterranea*. Reprinted from Biological Organization Ed. Academic Press N.Y., 167-182 (1963).
- Cape, M., Decroly, M., Ficq, A., Quertier, J. Etude du métabolisme de l'acide ribonucléique au cours du développement des œufs d'oursins. Arch. intern. Physiol. Bioch. **71** (4) 627-629 (1963).
- Limbosch-Rolin, S. Etude comparative des effets de différents agents sur la division de cellules cancéreuses et normales. Arch. Biol. **74** (1) 63-77 (1963).
- de Vitry, F. Etude autoradiographique de l'incorporation de <sup>3</sup>H-5-méthylcytosine chez *Acetabularia mediterranea*. Exptl. Cell Res. **31**, 376-384 (1963).
- Brachet, J., Decroly, M., Ficq, A., Quertier, J. Ribonucleic acid metabolism in unfertilized and fertilized sea-urchin eggs. Biochim. biophys. Acta **72**, 660-662 (1963).

- Brachet, J. Effects of puromycin on Morphogenesis in amphibian eggs and *Acetabularia mediterranea*. *Nature* **199** (4894) 714-715 (1963).
- Janowski, M. Incorporation de phosphore radio-actif dans les acides ribonucléiques de fragments nucléés et anucléés d'*Acetabularia mediterranea*. *Arch. intern. Physiol. Biochim.* **71** (5) p. 819 (1963).
- Baltus, E., Brachet, J. Presence of deoxyribonucleic acid in the chloroplasts of *Acetabularia mediterranea*. *Biochim. biophys. Acta* **76**, 490-492 (1963).
- Brachet, J. Le rôle du noyau cellulaire dans les synthèses et la morphogénèse. *Nova Acta Leopoldina N.F.* **26**, 17-27 (1963).
- Ficq, A., Brachet, J. Métabolisme des acides nucléiques et des protéines chez les embryons normaux et les hybrides létaux entre Echinodermes. *Exptl. Cell Res.* **32**, 90-108 (1963).
- Bieliavsky, N. Effets de la mitomycine sur l'incorporation de la thymidine tritiée dans les embryons d'Amphibiens au stade morula. *Exptl. Cell Res.* **32**, 342-353 (1963).
- Brachet, J. and Quertier, J. Cytochemical detection of cytoplasmic deoxyribonucleic acid (DNA) in amphibian oocytes. *Exptl. Cell Res.* **32**, 410-413 (1963).
- Brachet, J., Ficq, A., Tencer, R. Amino acid incorporation into proteins of nucleate and anucleate fragments of sea urchin eggs : effects of parthenogenetic activation. *Exptl. Cell Res.* **32**, 168-170 (1963).
- Brachet, J. Nouvelles observations sur les hybrides létaux entre Batraciens et entre Echinodermes. *Rev. Suisse de Zool.* **71**, 55-73 (1964).
- Brachet, J. Six, N., Bosseler, F. Effet différentiel de la ribonucléase sur l'incorporation des acides aminés dans les protéines des pointes de racines d'oignons *in vivo*. *Arch. intern. Physiol. Bioch.* **72**, 313-315 (1964).
- Mariano, E.E. The isolation of nuclei from *Xenopus laevis* embryonic cells. *Exptl. Cell Res.* **34**, 201-205 (1964).
- Heilporn-Pohl, V., Quertier, J. Effets de l'acide  $\alpha$ -lipoïque sur le métabolisme des acides nucléiques chez les embryons de Batraciens et de Poulet. *Developmental Biology* **9**, 155-175 (1964).
- de Vitry, F. Etude autoradiographique de l'incorporation d'actinomycine  $^{14}\text{C}$  chez *Acetabularia mediterranea*. *C.R. Acad. Sci. Paris* **258**, 4829-4831 (1964).
- Brachet, J. Acides ribonucléiques « messagers » et morphogénèse. *Bull. Acad. roy. Belg.* **49**, 862-887 (1964).
- Decroly, M., Cape, M., Brachet, J. Studies on the synthesis of ribonucleic acids in embryonic stages of *Xenopus laevis*. *Biochim. biophys. Acta* **87**, 34-39 (1964).
- Brachet, J., Ficq, A. Détection cytochimique au moyen d'actinomycine radioactive de l'acide désoxyribonucléique (DNA) cytoplasmique des œufs de Batraciens. *C.R. Acad. Sci. Paris* **258**, 6258-6260 (1964).
- Denis, H. Phosphoprotéines-phosphatase et résorption du vitellus chez les Amphibiens : une étude cytochimique, électrophorétique et immunologique. *J. Embryol. exp. Morph.* **12** (2) 197-217 (1964).
- Brachet, J. The role of nucleic acids and sulhydryl groups in morphogenesis (amphibian egg development, regeneration in *Acetabularia*). *Advances in Morphogenesis* **3**, 247-300. Academic Press (1964).

- Denis, H. Effets de l'actinomycine sur le développement embryonnaire. I. Etude morphologique : suppression par l'actinomycine de la compétence de l'ectoderme et du pouvoir inducteur de la lèvre blastoporale. *Developmental Biology* **9**, 435-457 (1964).
- Denis, H. Effets de l'actinomycine sur le développement embryonnaire. III. Etude biochimique : influence de l'actinomycine sur la synthèse des protéines. *Developmental Biology* **9**, 473-483 (1964).
- Brachet, J., Denis, H., de Vitry, F. The effects of Actinomycin D and puromycine on morphogenesis in amphibian eggs and *Acetabularia mediterranea*. *Developmental Biology* **9**, 398-434 (1964).
- de Vitry, F. Etude autoradiographique des effets de la 5-fluorodeoxyuridine, de l'actinomycine et de la puromycine chez *Acetabularia mediterranea*. *Developmental Biology* **9**, 484-504 (1964).
- Denis, H. Effets de l'actinomycine sur le développement embryonnaire. II. Etude autoradiographique : influence de l'actinomycine sur la synthèse des acides nucléiques. *Developmental Biol.* **9**, 458-472 (1964).
- Ficq, A. Effets de l'actinomycine et de la puromycine sur le métabolisme de l'oocyte en croissance. Etude autoradiographique. *Exptl. Cell Res.* **34**, 581-594 (1964).
- Lateur, L. Une technique de culture pour l'*Acetabularia mediterranea*. *Revue algologique* **1**, 26-37 (1964).
- Mariano, E.E. Une méthode pour l'isolement des noyaux de cellules embryonnaires. *Arch. intern. Physiol. Bioch.* **72** (2) p. 334 (1964).
- Schram, E., Cape, M., Meyer, S. Préparation de dérivés biologiques marqués au soufre-35 de haute activité spécifique (méthionine, taurine, acide cystéique, acide iséthionique, etc.) *Proc. intern. Sympos. Euratom, Brussels, 1963. Rapport Euratom EUR 1625 e, 1964, 399-1105.*
- Schram, E. Etude analytique des ribosomes 30s et 50s d'*Escherichia coli* *Arch. intern. Physiol. Bioch.* **72**, 695-697 (1964).
- Schram, E., Roosens, H. Application de la « disc » électrophorèse et de la scintillation à l'étude des protéines ribosomiales marquées au soufre-35. *Arch. intern. physiol. Bioch.* **72**, 697-698 (1964).
- Heilporn-Pohl, V. Effets de l'actinomycine D sur la morphogénèse et le métabolisme des acides nucléiques chez l'embryon de poulet. *J. Embryol. exp. Morphol.* **12** (3) 439-446 (1964).
- Ficq, A. Nucleocytoplasmic relations in the oocyte. Symposium "The Structure, Chemistry and Functions of Chromosomes". Istanbul. July 8-26 (1964). Publ. EUR 1836 et Serie B 19.21.
- Brachet, J. The contributions of cytochemistry to Molecular Biology. *Folia Histochem. Cytochem.* **1**, 389-396 (1963).
- Brachet, J. Nouvelles observations sur le rôle des acides nucléiques dans la morphogénèse. *Ist. Lombardo — Extrait de «Acidi nucleici e loro funzione biologica» Milano 16-18.9.63, 288-315 (1964).*
- Vanderhaeghe, F. Rôle des acides nucléiques dans la synthèse des protéines chez *Acetabularia mediterranea*. *Bull. Soc. Franç. Physiol. vég.* **9**, 65-77 (1963).
- Mariano, E., Schram, A. L'acide ribonucléique rapidement marqué dans les embryons de *Xenopus laevis*. *Arch. intern. Physiol. Bioch.* **72** (4) 691-692 (1964).

- Brachet, J., Goffeau, A. Le rôle des acides désoxyribonucléiques (DNA) dans la synthèse des protéines chloroplastiques chez *Acetabularia*. C.R. Acad. Sci. Paris **259**, 2899-2901 (1964).
- Malpoix, P. Influence of extraneous ribonucleic acid on the differentiation of haematopoietic tissue in chick embryos. Nature **203** (4944) 520-521 (1964).
- Goffeau, A., Brachet, J. Deoxyribonucleic acid-dependent incorporation of amino acids into the proteins of chloroplasts isolated from anucleate *Acetabularia* fragments. Biochim. biophys. Acta **95**, 302-313 (1965).
- Brachet, J. Le rôle des acides nucléiques dans la morphogénèse. Année biologique **4** (1,2) 21-48 (1965).
- Shephard, D. Chloroplast multiplication and growth in the unicellular alga *Acetabularia mediterranea*. Exptl. Cell Res. **37**, 93-110 (1965).
- Legros, F., Brachet, J. Effets de la puromycine sur la mitose, la synthèse des protéines et celle du DNA au cours de la segmentation de l'œuf de Batracien. J. Embryol. exp. Morph. **13** (2) 195-206 (1965).
- Brachet, J., Lang, A. The role of the nucleus and the nucleocytoplasmic interactions in morphogenesis. Handbuch d. Pflanzenphysiologie **15**, 1-40 (1965).
- Baltus, E., Quertier, J., Ficq, A., Brachet, J. Biochemical studies of nucleate and anucleate fragments isolated from sea-urchin eggs. A comparison between fertilization and parthenogenetic activation. Biochim. biophys. Acta **95**, 408-417 (1965).
- Brachet, J., Ficq, A. Binding sites of <sup>14</sup>C-actinomycin in amphibian oocytes and an autoradiography technique for the detection of cytoplasmic DNA. Exptl. Cell Res. **38**, 153-159 (1965).
- Bosseler, F., Six, N., Simic, D. Effets *in vivo* de la ribonucléase et de la puromycine sur l'incorporation de divers acides aminés dans les protéines de racines d'*Allium cepa*. Bull. Acad. roy. Belg. **50**, 5<sup>e</sup> série, 1183-1194 (1964).
- Brachet, J. Effects of histones on embryonic development. Nature **204** (4964) 1218-1219 (1964).
- Triplett, E.L., Steens-Lievens, A., Baltus, E. Rates of synthesis of acid phosphatases in nucleate and anucleate *Acetabularia* fragments. Exptl. Cell Res. **38**, 366-378 (1965).
- Van Gansen, P., Boloukhère-Presburg, M. Ultrastructure de l'algue unicellulaire *Acetabularia mediterranea*. J. Microsc. **4** (3) 347-362 (1965).
- Boloukhère-Presburg, M. Effet de l'actinomycine D sur l'ultrastructure des chloroplastes et du noyau d'*Acetabularia mediterranea*. J. Microsc. **4** (3) 363-372 (1965).
- Brachet, J. *Acetabularia*. "Endeavour", 155-161 (1965).
- Brachet, J. Emission de particules Feulgen positives dans le cytoplasme au cours de la maturation *in vitro* de l'oocyte de crapaud. C.R. Acad. Sci. Paris **261**, 1092-1094 (1965).
- Brachet, J. The role of nucleic acids in morphogenesis. Progress in Biophysics and Molecular Biology **15**, 97-127 (1965).
- Burny, A., Marbaix, G., Quertier, J., Brachet, J. Demonstration of functional polyribosomes in nucleate and anucleate fragments of sea-urchin eggs following parthenogenetic activation. Biochim. Biophys. Acta **103**, 526-528 (1965).

- Janowski, M. Synthèse chloroplastique d'acides nucléiques chez *Acetabularia mediterranea*. Biochim. Biophys. Acta **103**, 399-408 (1965).
- Geuskens, M. Synthèse de deux types différents de RNA dans le suc nucléaire de l'oocyte d'Astérie au début de l'oogénèse. Arch. Biol. **76**, 87-95 (1965).
- Geuskens, M. Etude, par autoradiographie et cytophotométrie, du métabolisme des protéines basiques au cours de l'oogénèse de l'oocyte d'Astérie. Bull. Acad. roy. Belg. **51**, 116-123 (1965).
- Geuskens, M. Etude autoradiographique et ultrastructurale de l'action de l'actinomycine D sur les oocytes d'Astéries. Exptl. Cell Res. **39**, 400-412 (1965).
- Geuskens, M. A study of the ultrastructure of nucleate and anucleate fragments of unfertilized sea-urchin eggs. Exptl. Cell Res. **39**, 413-417 (1965).
- Décroly, M., Cape, M. A study of ribosomes during embryonic development of *Xenopus laevis*. Biochim. biophys. Acta **103**, 601-609 (1965).
- Mariano, E.E., Schram-Doumont, A. Rapidly labelled ribonucleic acid in *Xenopus laevis* embryonic cells. Biochim. biophys. Acta **103**, 610-622 (1965).
- Brachet, J. Le contrôle de la synthèse des protéines en l'absence du noyau cellulaire. Faits et hypothèses. Bull. Acad. roy. Belg. **51**, 257-276 (1965).
- Brachet, J. Emission of Feulgen-positive particles during the *in vitro* maturation of toad ovocytes. Nature **208** (5010) 596-597 (1965).
- Bibring, T., Brachet, J., Gaeta, F., Graziosi, G. Some physical properties of cytoplasmic DNA in unfertilized eggs of *Arbacia lixula*. Biochimica Biophysica Acta **108**, 644-651 (1965).
- Brachet, J. The History of chemical Embryology. Biochemistry of animal Development **1**, 1-9 (1965) Academic Press.
- Brachet, J. A synthetic survey of reports presented at the Vesalius Symposium and their evaluation. Folia Histochem. et Cytochem. **3**, 177-189 (1965).
- Brachet, J. Synthèse des apports du Symposium et Evaluation. Arch. Biol. **76**, 611-634 (1965).
- Ficq, A. Sites de méthylation des acides ribonucléiques dans les oocytes d'Urodèles. Arch. Biol. **77**, 47-58 (1966).
- Brachet, J., Six, N. Quelques observations nouvelles sur les relations entre la synthèse des acides ribonucléiques et la morphogénèse chez *Acetabularia*. Planta **68**, 225-239 (1966).
- de Vitry, F. Etude du métabolisme des acides nucléiques chez *Acetabularia mediterranea*. I. Incorporation de précurseurs de DNA, de RNA et des protéines. Bull. Soc. Chimie Biol. **47**, 1325-1351 (1965).
- de Vitry, F. Etude du métabolisme des acides nucléiques chez *Acetabularia mediterranea*. II. Mise en évidence du rôle du DNA nucléaire à l'aide du phényléthyl-alcool et de la 5-fluoro-deoxyuridine, effets biologiques de l'actinomycine et de la puromycine. Bull. Soc. Chimie Biol. **47**, 1353-1373 (1965).
- de Vitry, F. Etude du métabolisme des acides nucléiques chez *Acetabularia mediterranea*. III. Etude autoradiographique des effets de l'actinomycine D et de la puromycine. Mise en évidence et rôle du DNA des chloroplastes. Bull. Soc. Chimie Biol. **47**, 1375-1397 (1965).

- Vanden Driessche, Thérèse. Circadian rhythms in *Acetabularia*: photosynthetic capacity and chloroplast shape. *Exptl. Cell Res.* **42**, 18-30 (1966).
- Van Assel, S., Brachet, J. Formation de cytasters dans les œufs de Batraciens sous l'action de l'eau lourde. *J. Embryol. exp. Morph.* **15**, 143-151 (1966).
- Baltus, E., Quertier, J. A method for the extraction and characterization of RNA from subcellular fractions of *Acetabularia*. *Biochim. biophys. Acta* **119**, 192-194 (1966).
- Heilporn-Pohl, V., Brachet, J. Net DNA synthesis in anucleate fragments of *Acetabularia mediterranea*. *Biochim. biophys. Acta* **119**, 429-431 (1966).
- Van Gansen, P. Effet de la fécondation sur l'ultrastructure du cytoplasme périphérique de l'œuf de *Xenopus laevis*. *J. Embryol. exp. Morphol.* **15**, 365-369 (1966).
- Van Gansen, P. Ultrastructure comparée du cytoplasme périphérique des oocytes mûrs et des œufs vierges de *Xenopus laevis*. *J. Embryol. exp. Morphol.* **15**, 355-364 (1966).

Plusieurs travaux sont encore sous presse et en voie de rédaction.

## 7.1 — Thèses

Ont défendu une thèse de Doctorat :

R. Tencer en 1961.

J. Quertier, S. Limbosch, V. Heilporn et M. Geuskens en 1965.

A passé une thèse d'agrégation de l'Enseignement supérieur :

P. Van Gansen en 1963.

## 7.2 — Déplacements

### 7.2.1 Stages à l'étranger :

Ont effectué un stage en :

*Italie* : Naples, à la Stazione Zoologica : A. Ficq (1961).

Naples, au Laboratoire international de Biophysique et de Génétique : J. Brachet, en tant que Directeur du Laboratoire; E. Baltus en 1963-1964; J. Quertier en 1963-1964-1965-1966, N. Six en 1964; A. Lievens en 1964; R. Tencer en 1964; F. Hanocq, M. Geuskens, S. Denis et M. Janowski en 1966.

*Etat Unis* : Baltimore et Philadelphie : R. Tencer (1963-1964).

Woodshole : E. Baltus (1965).

*Suède* : Göteborg : R. Tencer (1962).

*Angleterre* : Londres : R. Tencer (1965).

*Yougoslavie* : Institut Boris Kidric : A. Ficq (1963 et 1964).

*Brésil* : Rio de Janeiro : A. Ficq (1965).

7.2.2 *Ont assisté et participé à des conférences, des symposia et des cours :*

- en *France* : à Bordeaux : P. Van Gansen, M. Boloukhère, C. Thomas, M. Geuskens en 1966.  
à Paris : J. Brachet en 1964-1965 et 1966; A. Ficq en 1962 et M. Geuskens en 1965 et 1966.  
à Rouen : T. Vanden Driessche en 1966.  
à Royaumont : J. Brachet en 1962.  
à Strasbourg : J. Brachet en 1961 et 1964; P. Van Gansen en 1964.  
à Marseille : J. Brachet en 1962 et 1966; P. Van Gansen et M. Boloukhère en 1965.
- en *Angleterre* : à Londres : A. Ficq et R. Tencer en 1961.  
à Stratford : A. Ficq (1962).  
à Cardiff : J. Brachet (1962).  
à Edimbourg : J. Brachet (1963).  
à Cambridge : J. Brachet (1965).  
à Glasgow : J. Brachet (1965); M. Steinert (1965 et 1966).
- en *Italie* : à Frascati : J. Brachet (1965).  
à Palerme : A. Ficq (1961); J. Brachet (1965).  
à Pavie : A. Ficq (1961).  
à Rome : J. Brachet (1961 et 1965); A. Ficq (1961).  
à Naples : A. Ficq (1961). – I.O.P.A.B. : J. Brachet, A. Ficq, R. Tencer, J. Quertier, M. Decroly en 1965.  
à Ravello : E. Baltus (1963).  
à Varenne : J. Brachet (1962).
- en *Allemagne* : à Heidelberg : A. Ficq (1961).  
à Mosbach : J. Brachet (1963).  
en Bavière : T. Vanden Driessche (1964).
- en *Autriche* : à Vienne : T. Vanden Driessche (1966).
- en *Finlande* : à Helsinki : A. Ficq, V. Heilporn, J. Quertier (1963).
- en *Grèce* : à Spetsai : J. Quertier (1966).
- en *Pologne* : à Varsovie : J. Brachet en 1963.
- en *Tchécoslovaquie* : à Prague : J. Brachet en 1961; M. Geuskens en 1964.
- aux *Pays-Bas* : à Lunteren : J. Brachet en 1966.  
à Leyden : A. Ficq; M. Geuskens, C. Thomas, M. Steinert en 1966.
- en *Israël* : à Jérusalem : J. Brachet en 1966.
- en *Turquie* : à Istanbul : A. Ficq en 1963.
- aux *Etats Unis* : à Gatlinburg : J. Brachet (1962).  
à New York : J. Brachet en 1962; R. Tencer en 1963 et 1964.  
à Berkeley : J. Brachet en 1965.  
à Houston : J. Brachet en 1965.
- en *Uruguay* : à Montevideo : A. Ficq en 1965.
- au *Venezuela* : à Caracas : J. Brachet en 1963; M. Steinert en 1966.

## 8 — TITRES ACADEMIQUES ET SCIENTIFIQUES

*Le Professeur J. Brachet a été nommé Robert Hooke Lecturer à l'Université du Texas, USA en 1964.*

- Membre correspondant de l'Académie royale de Médecine de Belgique (1962).
- Honorary Member of the American Society of Biochemical Chemists (1961).
- Membre de la Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina (Mitglied), Halle (1962).
- Membre de l'Istituto Lombardo. Accademia di Scienze e Lettere à Milan (1964).
- Foreign Member of the National Academy of Sciences de Washington (1965).
- Membre de l'Académie Serbe des Sciences (1965).
- Member of the Royal Society London (1966).

*Doctorats honoris causa.*

Le Professeur J. Brachet est Docteur honoris causa de :

- la Faculté de Médecine de l'Université de Turin (1960).
- la Faculté de Médecine de l'Université de Palerme (1962).
- la Faculté des Sciences de l'Université d'Edimbourg (1962).
- la Faculté des Sciences de l'Université de Strasbourg (1964).
- de l'Institut agronomique de Gembloux (Belgique) (1966).

Le Professeur J. Brachet a obtenu la Médaille Schleiden (Academia Leopoldina) (1961).

*A. Ficq a obtenu le Prix international d'Embryologie Albert Brachet en 1962.*

*M. Steinert a été élu*

- membre de la Royal Society of Medicine (Londres, 1966);
- membre d'honneur de l'Asociacion ASOVAC (Caracas, 1966).

Laboratoire de Chimie Biologique  
par H. CHANTRENNE

Les travaux du laboratoire de Chimie biologique ont été consacrés à l'étude du mécanisme de la biosynthèse des protéines. Les buts précis que nous nous sommes proposés sont les suivants :

- Isoler un RNA messenger naturel en quantités pondérables et étudier ses propriétés.
- Etudier le centre actif d'un enzyme d'activation et les propriétés moléculaires dont dépendent les interactions spécifiques de l'enzyme avec le RNA de transfert correspondant.
- Comparer les systèmes de déchiffrement de l'information génétique de deux tissus différenciés.
- Analyser les perturbations de la synthèse des protéines qui résultent de l'introduction d'une purine anormale dans les RNA d'une bactérie.
- Poursuivre l'étude de la synthèse induite des enzymes hématiniques chez la levure.

Chacun de ces sujets a été confié à une petite équipe, de deux à cinq chercheurs, dont la plupart préparaient une thèse de doctorat. Au cours des cinq années, ces équipes se sont donc partiellement renouvelées, mais la continuité des recherches a été assurée.

L'évolution des techniques fut considérable : souvent réduits il y a cinq ans, à utiliser des techniques rudimentaires, les chercheurs ont disposé des techniques les meilleures pendant les trois dernières années.

Les principaux résultats obtenus sont résumés ci-après :

**1 — ISOLEMENT ET ETUDE DU RNA MESSENGER  
DES RETICULOCYTES DE LAPIN**

**1.1 — Introduction**

S'il est vrai que les polynucléotides artificiels ont fait faire des progrès décisifs à la connaissance du mécanisme de la synthèse des protéines, la possession d'un messenger naturel reste indispensable. En effet, les polynucléotides artificiels sont des modèles imparfaits de messenger : ils ne comportent, par exemple, aucun signal de début ou de fin de lecture; or, de tels signaux doivent exister dans les messagers naturels, que ce soient des séquences ou des groupes chimiques particuliers, ou encore une structure secondaire ou des propriétés géométriques caractéristiques. Un messenger d'origine animale serait préférable à un messenger bactérien car il est concevable que des relations particulières existent entre messenger et système de déchiffrement dans les tissus différenciés. Enfin, il serait souhaitable de posséder le messenger d'une protéine dont la structure est connue.

Il nous a semblé que le messenger des réticulocytes de lapin satisferait assez bien à toutes les exigences. Dintzis a montré en effet que l'hémoglobine représente plus de 95 % des protéines formées par les réticulocytes de lapin; l'hémoglobine étant faite de deux chaînes dont les gènes ne sont pas liés. On peut donc supposer, en première approximation, que les réticulocytes ne contiennent comme RNA messagers que les deux messagers de l'hémoglobine.

Plusieurs groupes de chercheurs, en France, en Grande-Bretagne et aux Etats-Unis, ont essayé d'isoler les messagers de l'hémoglobine en recherchant parmi les RNA extraits de réticulocytes ceux qui stimulent le mieux l'incorporation d'acides aminés dans des protéines, voire dans l'hémoglobine, *in vitro*. Les résultats de leurs expériences sont décevants : en effet, les RNA de réticulocyte stimulent fort mal le système classique de Nirenberg, et dans les extraits de réticulocytes capables de faire de l'hémoglobine *in vitro* toutes les fractions de RNA stimulent cette synthèse.

C'est par une voie radicalement différente que nous avons, croyons-nous, atteint le but que nous nous étions proposé : nous avons cherché à identifier le RNA messenger en nous basant non pas sur ses propriétés messagères, mais sur d'autres caractéristiques qu'on pouvait lui attribuer. Par exemple, bien qu'il eût la vie longue (par comparaison avec les messagers bactériens), on pouvait parier que le messenger de l'hémoglobine se marquerait plus vite que les RNA ribosomiaux dans les cellules rouges de la moelle, et qu'il ne se marquerait pas (non plus que les RNA ribosomiaux) dans les réticulocytes qui n'ont plus de noyau. On pouvait affirmer, d'autre part, que le messenger se trouvait dans les polyribosomes, puisque ceux-ci font de l'hémoglobine *in vitro*; il constitue la fibre de RNA qui unit les ribosomes, si l'idée qu'on se fait des polyribosomes est correcte. C'est pourquoi nous avons cherché à isoler cette fibre de RNA des polyribosomes de réticulocytes en nous appuyant, pour l'identifier, sur les deux critères suivants : cet RNA devait se marquer plus vite que les RNA ribosomiaux, et être extrêmement sensible au traitement des polyribosomes par la ribonucléase.

## 1.2 — Incorporation de précurseurs marqués dans les RNA de réticulocytes

Pour tirer parti du marquage différentiel qui servirait de critère pour identifier le messenger, il fallait d'abord étudier le marquage des RNA connus des réticulocytes. En effet, lorsque ce travail fut commencé, en 1962, il existait dans la littérature plusieurs indications de ce que les réticulocytes, bien qu'ils fussent dépourvus de noyau, pouvaient incorporer du phosphore radioactif dans leurs acides nucléiques. A. Burny vérifia qu'il en était bien ainsi mais il établit que presque tout le phosphore marqué se trouve dans les RNA de transfert; on l'y trouve uniquement dans l'acide adénylique terminal et dans l'acide cytidylique voisin. La majeure partie de l'incorporation de phosphore radioactif dans le RNA des réticulocytes reflète donc le renouvellement de la séquence terminale CCA caractéristique des RNA de transfert. Toutefois, dans certaines préparations de réticulocytes, jusqu'à 40 % de l'incorporation se faisait dans les RNA très polydispersés à poids moléculaire élevé. Burny montra que ces RNA provenaient en fait des quelques lymphocytes qui contaminent encore les préparations de réticulocytes malgré toutes les précautions prises pour les éliminer, et dans lesquels la synthèse des RNA est très active.

A. Burny et G. Marbaix déterminèrent ensuite les conditions dans lesquelles les RNA ribosomiaux des réticulocytes pourraient être marqués; ils se forment dans les cellules souches de la moelle. L'expérience montra que les RNA ribosomiaux étaient bien marqués lorsqu'on injectait à un lapin anémié 10 mC de phosphate radioactif de 10 à 30 heures avant de prélever le sang. On pouvait parier que dans ces conditions le RNA messenger se marquerait aussi.

## 1.3 — Détection du RNA messenger

A. Burny et G. Marbaix isolèrent les polyribosomes de réticulocytes marqués dans les conditions indiquées ci-dessus, et fractionnèrent les RNA qu'ils avaient réussi à en extraire. Essayant systématiquement les méthodes classiques d'extraction des RNA (phénol, chlorure de

lithium, chlorhydrate de guanidine) et des durées de marquage échelonnées de 5 à 30 heures, ils essayèrent d'abord de nombreux échecs. Enfin, en dispersant les polyribosomes dans une solution de dodécylsulfate et en analysant directement l'extrait par centrifugation en gradient, ils décelèrent une fraction nucléique nouvelle sédimentant entre les RNA ribosomiaux et les RNA de transfert et dont la radioactivité spécifique était très supérieure à celle des RNA ribosomiaux. Elle ne fut repérée que grâce à sa radioactivité, la quantité de RNA qu'elle contenait ne causait aucune absorption mesurable dans l'ultraviolet. Contrairement aux autres RNA, cette fraction nouvelle était détruite lorsque les polyribosomes avaient subi l'action de 0,01  $\mu$ g de ribonucléase pendant quelques minutes. Elle possédait donc les deux caractéristiques qui devaient servir à identifier la fibre de RNA des polyribosomes : marquage intense et sensibilité extrême à la ribonucléase.

Il restait à isoler ce nouvel RNA en quantités plus grandes.

#### 1.4 — Isolement du RNA messager

Une fois ce nouvel RNA repéré, son isolement ne posait plus que des problèmes techniques. En accroissant la quantité de matériel mis en jeu on put bientôt détecter directement le nouvel RNA par spectrophotométrie. Une première méthode d'isolement permit d'en isoler 50  $\mu$ g. Cela suffisait pour faire quelques expériences de sédimentation dans la centrifugeuse d'analyse. Celles-ci (qui furent faites dans le laboratoire de Mr. Brachet) indiquèrent que le RNA isolé sédimente comme une substance très homogène et que son coefficient de sédimentation est un peu supérieur à 9S. S'il s'agit d'un RNA monocaténaire comme son extrême sensibilité à la ribonucléase l'indique, on peut estimer son poids moléculaire à 150 000. C'est ce qu'on prévoirait pour chacun des messagers de l'hémoglobine puisque les deux chaînes protéiques comptent respectivement 141 et 146 acides aminés.

Utilisant simultanément cinq ultracentrifugeuses préparatives, G. Marbaix et A. Burny isolèrent 200  $\mu$ g de RNA messager; ils purent en déterminer la composition. Elle diffère nettement de celle des autres RNA du réticulocyte et aussi de celle du DNA. C'est ce qu'on pouvait attendre puisque les messagers de l'hémoglobine doivent être transcrits sur une des chaînes du DNA. Une observation qui n'a pas encore reçu d'explication est que la composition calculée à partir de la distribution du P radioactif entre les nucléotides ne s'accorde pas avec le dosage direct des nucléotides séparés par chromatographie sur colonne. Le déséquilibre des pools de précurseurs devrait être extrême pour rendre compte de cette discordance. Aussi pensons-nous plutôt à d'autres possibilités : présence d'une petite quantité d'un contaminant riche en adénine, différence notable de vitesse de synthèse des deux messagers, métabolisme particulier d'une séquence terminale.

Avec l'active participation de M. E. Schram, la méthode d'isolement du RNA messager a été adaptée à la centrifugeuse zonale d'Anderson, qui permet d'obtenir plus rapidement des quantités de cinq à dix fois plus grandes qu'une centrifugeuse préparative ordinaire. Enfin, tout récemment, une méthode radicalement différente a été trouvée pour isoler le même RNA.

#### 1.5 — Nouvelle méthode d'isolement du RNA messager

Des observations sur les conditions de stabilité des polyribosomes ayant montré que ceux-ci sont détruits quand la concentration des ions  $Mg^{++}$  est fortement abaissée, il sembla qu'on pourrait tirer parti de ce phénomène pour détacher le messager des ribosomes sans détruire ceux-ci. A. Burny, G. Marbaix, G. Huez et B. Lebleu réussirent bientôt à séparer le même RNA 9S des polyribosomes, soit en faisant passer la suspension au travers d'une petite colonne de carboxyméthylcellulose qui retient les cations, ou encore en ajoutant simplement de l'acide éthylène diamine tétracétique qui complexe les ions  $Mg^{++}$ . Le RNA messager est ainsi libéré et peut être séparé facilement des particules ribosomiales. Le RNA isolé selon ce nouveau principe est identique à celui que l'on obtenait par la première méthode.

## 1.6 — Propriétés du RNA messager

Le RNA isolé possède donc les caractéristiques suivantes qui permettent de le considérer comme le messager : il se marque six fois plus vite que les RNA ribosomiaux, il est libéré quand les polyribosomes se dissocient en l'absence d'ions  $Mg^{++}$ , il est détruit sélectivement lorsque les polyribosomes subissent un traitement à la ribonucléase juste suffisant pour briser la fibre de RNA sans affecter les RNA constitutifs des ribosomes, sa constante de sédimentation a la valeur qu'on prévoirait pour les messagers (monocistroniques) de chacune des chaînes de l'hémoglobine.

Il reste à établir si ce RNA porte bien l'information génétique qui détermine la synthèse de l'hémoglobine. Nous avons donc étudié la fixation de ce RNA sur les ribosomes d'*E. coli* et son effet sur l'incorporation d'acides aminés dans le système de Nirenberg. Avec un système qui répond parfaitement à l'addition d'acide polyuridylique ou de RNA du phage  $MS_2$  (aimablement fourni par Mr. W. Fiers) le RNA 9S de réticulocytes ne provoque aucune stimulation de l'incorporation d'acides aminés. Au contraire, il entre en compétition avec ces autres messagers; il se fixe comme eux sur les particules 30S.

Tout se passe donc comme si notre RNA 9S se fixait sur les ribosomes à la même place que les autres messagers (RNA de  $MS_2$  ou acide polyuridylique), mais comme s'il ne pouvait pas être déchiffré par le système de Nirenberg. Si l'on songe que n'importe quel polynucléotide, à séquences aléatoires, provoque l'incorporation d'acides aminés dans ce système, il faut bien en conclure que notre RNA possède des propriétés particulières qui méritent d'être étudiées : il pourrait par exemple comporter une séquence qui ne correspondrait à aucun RNA de transfert d'*E. coli*, ou bien une structure secondaire défavorable à sa progression. Ces questions sont à l'étude.

## 1.7 — Examen du RNA 9S au microscope électronique

L'observation directe du RNA au microscope électronique devrait permettre de mesurer directement la longueur des molécules et de la comparer à celle de la fibre des polyribosomes. Elle permettrait de voir de plus si les fibres sont ouvertes ou circulaires; l'existence de nombreux polyribosomes en rosettes dans les réticulocytes permet en effet de penser que le messager des polyribosomes intacts pourrait être circulaire.

G. Huez a entrepris cette étude avec l'aide de Mme P. Van Gansen. Les observations faites à l'aide du petit microscope Hitachi n'ont pas donné de résultats satisfaisants, la résolution étant insuffisante. Elles sont à présent répétées avec le grand microscope AEI.

## 2 — RECHERCHES SUR LES ENZYMES D'ACTIVATION ET LEURS INTERACTIONS AVEC LES RNA DE TRANSFERT

### 2.1 — Introduction

Les enzymes d'activation accomplissent deux opérations distinctes : ils catalysent la formation d'aminoacyladénylate et ils transfèrent ensuite l'acide aminé au RNA correspondant. Chaque enzyme d'activation est donc capable de distinguer un acide aminé parmi tous les autres, de reconnaître le RNA de transfert adéquat et de catalyser deux réactions coordonnées.

Les enzymes d'activation posent de beaux problèmes de structure moléculaire et d'interactions entre macromolécules; nous en avons entrepris l'étude en 1964.

## 2.2 — Dénaturation contrôlée d'enzymes d'activation

Après avoir apporté aux méthodes de dosage de ces enzymes d'ingénieuses améliorations techniques qui en augmentent la précision, H. Grosjean s'est efforcé de répondre à la question suivante : le site d'activation de l'acide aminé et le site de la réaction de transfert sont-ils distincts, peuvent-ils être dissociés? S'inspirant de travaux consacrés à d'autres enzymes « à deux têtes », il essaya de dénaturer partiellement par la chaleur des enzymes d'activation et de mesurer les deux activités catalytiques (activation et transfert) au cours de la dénaturation.

Avec l'isoleucyl-s-RNA synthétase d'*E. coli* (isolée selon P. Berg), H. Grosjean et G. de Vries constatèrent que les deux activités étaient affectées au même degré par le traitement thermique. Cette constatation ne conduisait à aucune conclusion utile. Mais des essais semblables avec l'enzyme correspondant de *B. thermophilus* devaient donner des résultats beaucoup plus significatifs. Une étude systématique de la dénaturation thermique de cet enzyme, entreprise par H. Grosjean et J. Charlier montra que les deux activités peuvent être nettement dissociées : l'enzyme maintenu 10 minutes à 70 °C perd complètement la capacité de charger le RNA (mesures d'activité à 40 °C) alors que sa capacité d'activer l'acide aminé est peu affectée. Certaines particularités structurales indispensables pour le transfert, peuvent donc être perdues sans que la réaction de l'acide aminé avec l'ATP en soit affectée.

Plus intéressante encore est l'observation suivante : l'enzyme chargé d'isoleucyladénylate (le produit de la première réaction) est protégé. La dénaturation thermique est beaucoup plus lente et, contrairement à ce qui se passe pour l'enzyme libre, les deux activités catalytiques sont abolies en même temps. Le produit de la première réaction stabilise donc la structure moléculaire nécessaire à l'accomplissement de la seconde.

## 2.3 — Modification des RNA de transfert par l'hydroxylamine

On peut espérer obtenir des renseignements sur les interactions RNA-enzymes d'activation en étudiant les effets de modifications chimiques des RNA de transfert sur leur capacité de charge ou sur la vitesse du transfert. Pour modifier les RNA de transfert, nous avons choisi l'hydroxylamine qui détruit spécifiquement la cytosine et dont l'action est lente et facile à contrôler.

Le défaut de cette approche est évidemment que l'agent chimique attaquera les molécules de RNA en plusieurs points; on sait d'avance que son action sera multiple et sans doute complexe. Une difficulté supplémentaire est que nous n'avons pu utiliser jusqu'ici qu'un mélange de RNA de transfert, l'isolement d'un RNA de transfert unique n'étant pas, techniquement, à notre portée. Aussi n'est-il pas étonnant que bon nombre d'observations soient difficiles à interpréter. Néanmoins certaines d'entre elles donnent des indications de caractère général sur l'importance de la structure secondaire des RNA et sur les fondements de la spécificité d'interaction des RNA avec les enzymes d'activation. Nous en donnerons ci-dessous deux exemples.

Il est bien connu que les RNA de transfert peuvent être chauffés sans dommage à une température supérieure à leur point « de fusion »; après refroidissement, ils recouvrent intégralement leur capacité de charge et de transfert. Cela signifie ou bien que la structure secondaire de ces RNA importe peu, ou bien qu'elle se rétablit correctement avec la plus grande facilité.

Les résultats obtenus par G. de Vries permettent de conclure en faveur de la seconde alternative. Ils montrent en effet que les RNA de transfert qui ont subi un traitement limité par l'hydroxylamine, et dont la capacité acceptrice n'a été que faiblement réduite, sont inactivés irréversiblement par la chaleur. Il est clair que leur structure secondaire importait et qu'après « fusion » la molécule modifiée ne s'est pas repliée correctement. Cela indique aussi que certaines cytosines peuvent être détruites sans que la capacité de charge du RNA soit affectée; ces cytosines ne sont donc pas impliquées dans les interactions du RNA avec l'enzyme, elles ne sont pas non

plus requises pour maintenir la structure secondaire, mais leur intégrité est indispensable pour que le polynucléotide, une fois déroulé, se replie correctement. Si ce raisonnement est correct, il conduit à une conclusion d'ordre général, à savoir que certaines particularités de la séquence des bases du RNAs n'ont d'importance, de fonction, qu'au moment de la synthèse du RNA : elles contribuent à assurer le repliement correct de la molécule.

Nul ne sait quelles sont les particularités du RNA que l'enzyme d'activation qui lui correspond reconnaît. On peut imaginer deux types extrêmes de reconnaissance : l'enzyme pourrait reconnaître une séquence de bases, l'anticodon par exemple, ou bien l'interaction RNA-enzyme pourrait dépendre d'une coaptation plus complexe des structures tertiaires des deux macromolécules. D'autres résultats de G. de Vries jettent peut-être quelque lumière sur ce problème. Un RNA de transfert dont l'extrémité acceptrice est oxydée par le périodate est évidemment incapable d'accepter l'acide aminé; il est cependant encore reconnu par l'enzyme puisqu'il se comporte comme un inhibiteur compétitif de la charge du RNA normal correspondant. G. de Vries a montré que lorsque les RNA de transfert oxydés par le périodate sont traités par l'hydroxylamine, l'inhibition qu'ils exercent sur la charge d'un RNA intact s'accroît, et qu'elle reste du type compétitif. Il faut bien en conclure que certains RNA de transfert qui étaient rejetés par l'enzyme peuvent maintenant être confondus par celui-ci avec le RNA spécifique ou bien qu'ils peuvent se fixer sur l'enzyme de manière non spécifique. Cela suggère que les enzymes ont une affinité assez générale pour des polynucléotides variés et que la structure particulière de chaque RNA de transfert restreint les possibilités d'interaction avec les enzymes d'activation qui ne le concernent pas. Si l'enzyme reconnaissait avant tout une séquence de bases, on s'attendrait à voir les interactions affaiblies et non renforcées par la destruction de certaines bases. Il est donc probable que la spécificité des enzymes d'activation pour le RNA correspondant repose en partie sur une restriction des possibilités de coaptation des deux types de macromolécules.

#### 2.4 — Modification physique des RNA de transfert par la proflavine

Les acridines se fixent sur les acides désoxyribonucléiques; il semble bien qu'elles s'intercalent entre les bases empilées dans la double hélice.

J. Wérenne et H. Grosjean ont montré que la proflavine peut aussi se fixer sur les acides nucléiques de transfert et qu'elle modifie leur réactivité vis-à-vis des enzymes d'activation.

Lorsqu'on mélange une solution de RNA de transfert à une solution de proflavine, le maximum d'absorption de celle-ci se déplace instantanément vers les grandes longueurs d'ondes. Le complexe formé est très stable, il résiste à la dialyse et se sépare complètement de la proflavine libre sur une colonne de Sephadex. Il se dissocie en présence d'ions  $Mg^{++}$  à concentration suffisante. L'ultracentrifugation d'analyse montre que le coefficient de sédimentation du complexe RNA-proflavine ne diffère pas de celui du RNA libre; ce n'est qu'aux concentrations très élevées de proflavine que des agrégats apparaissent.

J. Wérenne et H. Grosjean ont ensuite étudié la stabilité du complexe dans la zone de températures où le RNA est partiellement dénaturé. Dans toute cette zone, la quantité de proflavine liée est proportionnelle à la quantité de RNA natif; le RNA complètement dénaturé ne fixe aucunement la proflavine. Le même phénomène s'observe pour un DNA dont la température de fusion est pourtant supérieure de  $20^\circ$  à celle des RNA de transfert. Dans les deux cas, le complexe proflavine-acide nucléique est détruit en même temps que les interactions entre bases qui sont responsables de l'effet hypochrome.

On peut en conclure que la proflavine se fixe dans une région des RNA de transfert dans laquelle les bases sont empilées; et par analogie avec son action sur les DNA, on peut supposer que la proflavine cause une distorsion d'une région hélicoïdale des RNA de transfert.

Les RNA dont la structure « tertiaire » est ainsi déformée ne réagissent plus normalement avec les enzymes d'activation. Leur capacité de charge (quantité d'un acide aminé fixée par mg de RNA) est réduite; en outre, la vitesse du transfert de l'acide aminé au RNA est fortement diminuée bien que l'activation de l'acide aminé par l'enzyme ne soit aucunement affectée, même par des concentrations vingt fois supérieures de proflavine.

Une légère distorsion de la molécule de RNA de transfert suffit donc à perturber ses interactions avec l'enzyme d'activation. Des essais en cours montreront si la spécificité du transfert en est affectée.

### **3 — RECHERCHES SUR LA DIFFERENCIATION DE LA MACHINE A FAIRE LES PROTEINES**

#### **3.1 — Introduction**

Différenciation implique expression différentielle de caractères génétiques. Il y a tout lieu de croire que la transcription de certains gènes est permise dans certains tissus et réprimée dans d'autres. Mais des contrôles ou des restrictions doivent exister aussi au niveau de la traduction de l'information génétique (voir à ce sujet le rapport du laboratoire de Morphologie animale du Professeur J. Brachet).

Afin de voir si le système qui traduit l'information génétique se différencie ou s'il reste identique à lui-même dans tous les tissus d'un animal, nous avons comparé, dans deux tissus du lapin, des éléments essentiels de ce système : les protéines ribosomiales et les enzymes d'activation des acides aminés.

#### **3.2 — Protéines ribosomiales du foie et des réticulocytes de lapin**

Les ribosomes contiennent de nombreuses protéines basiques qui peuvent être séparées par électrophorèse en milieu figé (Waller). La fonction de ces protéines est complètement inconnue, mais puisque les ribosomes sont impliqués dans le déchiffrement de l'information, il est raisonnable de penser que leurs protéines y participent (voir à ce propos le rapport du laboratoire de Génétique du Professeur R. Thomas). C'est pourquoi nous avons comparé les diagrammes d'électrophorèse des protéines ribosomiales des réticulocytes et du foie du lapin.

En 1962, un premier essai d'orientation avait montré que les ribosomes de réticulocytes, qui ne font guère que de l'hémoglobine, contiennent un assortiment de protéines aussi complexe que les ribosomes du foie. Les protéines les plus abondantes semblaient se retrouver dans les deux tissus. D'autres bandes plus floues apparaissaient lors de la séparation électrophorétique mais leur comparaison était incertaine car la résolution de l'électrophorèse en gel d'amidon, utilisée alors par L. Utjan, était médiocre.

L'apparition de la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide, dont le pouvoir de résolution est excellent, nous a permis de reprendre cette recherche. Mme C. Platten-Godfroid a confirmé les observations de L. Utjan, et elle a observé, à côté de ressemblances certaines, des différences nettes dans l'assortiment des protéines ribosomiales du foie et des réticulocytes.

Les ribosomes furent dissociés en particules 30S et 60S et les protéines de ces particules étudiées comme précédemment. Trois conclusions peuvent être tirées des résultats de ces expériences.

- Les diagrammes d'électrophorèse des particules 30S et 60S d'un même tissu ne se ressemblent pas; les particules des deux classes sont complètement différentes, tant par leurs protéines que par leurs RNA.
- Les diagrammes d'électrophorèse des particules 60S de foie et de réticulocytes paraissent identiques.
- Au contraire, des différences qualitatives très nettes s'observent entre les diagrammes d'électrophorèse des particules 30S de réticulocyte et de foie.

Des résultats comme ceux-ci sont toujours en butte à une critique facile, mais justifiée; on peut craindre que les différences soient dues à des protéines adsorbées aux particules 30S, et cela d'autant plus que la ribonucléase soluble extracellulaire d'*E. coli*, par exemple, se fixe sur les particules 30S lors de la préparation des extraits. Afin d'éviter autant que possible des contaminations de cette sorte, ou d'éliminer les protéines adsorbées, nous avons toujours soumis les particules ribosomiales à la chromatographie sur DEAE cellulose et nous les avons traitées par des solutions concentrées de sels, selon les méthodes classiques; des essais de contamination délibérée de ribosomes de foie par l'extrait de réticulocytes et vice-versa n'ont pas modifié les résultats.

Avec ces réserves, les résultats de Mme Platten-Godfroid permettent de penser que les particules 30S se différencient au cours du développement, alors que les particules 60S pourraient être identiques dans différents tissus.

Il est frappant, d'autre part, que les diagrammes d'électrophorèse des particules 60S sont toujours très nets, ceux des particules 30S beaucoup plus flous et plus complexes (bien que ces particules soient beaucoup plus petites); il n'en serait pas autrement si chaque tissu contenait une population hétérogène de particules 30S.

La chromatographie sur carboxyméthylcellulose permettra sans doute d'isoler les protéines ribosomiales et de préciser les différences observées. Les premiers résultats obtenus sont encourageants.

### 3.3 — Enzymes d'activation de foie et de réticulocytes

La dégénérescence du code, la multiplicité des RNA de transfert spécifiques d'un même acide aminé, le degré de méthylation de ces RNA sont des sources de diversification du système de déchiffrement de l'information.

Nous nous sommes donc posé la question suivante : les RNA de transfert et les enzymes d'activation des acides aminés sont-ils identiques dans deux tissus différenciés, et plus précisément les enzymes d'activation d'un tissu peuvent-ils transférer les acides aminés aux RNA de transfert d'un autre tissu du même animal?

Un résultat clair a été obtenu cette année-ci par F. Pécheux : les enzymes de réticulocytes mettent deux fois moins de leucine que les enzymes de foie sur le RNA de transfert de foie. Après saturation du RNA de foie en présence d'enzyme de réticulocytes, l'addition d'enzyme du foie provoque une nouvelle fixation de leucine; la quantité totale fixée est alors égale à celle qui est fixée normalement par l'extrait de foie seul.

Nous pouvons en conclure que le foie possède au moins deux RNA de transfert de la leucine, et qu'il existe dans les réticulocytes un enzyme capable de charger l'un de ces RNA et pas l'autre. L'enzyme capable de charger l'autre RNA n'a été trouvé dans aucune préparation de réticulocytes alors qu'il est toujours présent et très actif dans les extraits de foie.

### 3.4 — Remarque

Montrer une différence biochimique entre deux organes ou deux tissus différenciés est une banalité. Mais les différences indiquées ci-dessus concernent des éléments du système qui traduit l'information génétique; d'elles pourraient dépendre la traduction ou le refus de certains messages. Par exemple, si dans un tissu tel RNA de transfert ne peut pas être chargé, le codon correspondant ne sera pas déchiffré et les messages qui le contiennent ne seront pas exprimés. La perte d'un RNA de transfert ou de l'enzyme qui le charge affecterait simultanément l'expression de nombreux gènes; peut-être est-ce là un des rouages de la différenciation. Les analogies d'un tel mécanisme avec celui de la suppression des mutations «non-sense» chez les bactéries sont évidentes.

## 4 — FORMATION DES ENZYMES HEMATINIQUES CHEZ LA LEVURE

### 4.1 — Introduction

La formation du système respiratoire de la levure dépend à la fois de gènes nucléaires et de facteurs non mendéliens. Les enzymes, absents chez la levure cultivée à l'abri de l'air, apparaissent lorsque la culture (ou même la levure en suspension dans un milieu contenant une source de carbone) est mise au contact de l'air. Toute la chaîne respiratoire apparaît, ainsi que quelques peroxydases et quelques déshydrogénases, tandis que les structures caractéristiques des mitochondries (lamelles, crêtes) se développent.

La formation du système respiratoire pose donc des problèmes étroitement liés de contrôle génétique, hérédité cytoplasmique, induction coordonnée, morphopoïèse.

### 4.2 — Cytochrome peroxydase

Le contrôle génétique de la synthèse de cet enzyme est normal, il ne dépend pas de facteurs non mendéliens. Mais sa formation induite n'obéit pas au schéma classique.

H. Chantrenne avait brièvement signalé jadis que l'activité cytochrome-peroxydasique est induite par l'oxygène. Toutefois, des chercheurs américains contestèrent cette observation : ils trouvaient autant de cytochrome peroxydase dans la levure anaérobie que dans la levure aérée. A. Sels étudia systématiquement les conditions d'extraction et de dosage de l'enzyme, il détermina avec précision la cinétique de l'oxydation du cytochrome c par la peroxydase, et il étudia les conditions optimales d'apparition de l'enzyme. Il put ainsi vérifier que la levure cultivée en anaérobiose stricte est dépourvue de cytochrome peroxydase et il souligna que des traces d'oxygène peuvent provoquer son apparition : il y a assez d'oxygène dans l'azote commercial pour faire apparaître l'enzyme; le système respiratoire au contraire ne se forme que lorsque la tension d'oxygène est plus élevée. Les résultats erronés des chercheurs américains s'expliquent donc par l'imperfection de leurs méthodes : l'anaérobiose n'était pas assez stricte.

A. Sels a montré de plus que l'activité cytochrome peroxydasique apparaît, sous l'action de l'oxygène, même lorsque la synthèse des protéines est bloquée à 98 % par la cycloheximide. Tout se passe comme si l'enzyme actif se formait à partir d'une protéine préexistante, par activation ou conversion, mais sans synthèse de novo. La formation induite de la cytochrome peroxydase ne peut donc pas être rangée parmi les phénomènes de synthèse induite dont le type classique est celle de  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* et qui reposent sur le contrôle de la synthèse d'un RNA messenger. Dans le cas présent, il faut penser plutôt à une réorganisation moléculaire, comparable peut-être à celle des protéines allostériques, ou à l'activation du trypsinogène, ou à quelque autre processus de parachèvement : modification d'acides aminés, fixation du groupe hématinique.

La cytochrome peroxydase n'est pas la seule hémoprotéine qui apparaisse dans ces conditions; la formation de l'un des cytochromes c présente beaucoup d'analogies avec celle de la cytochrome peroxydase.

### 4.3 — Isocytochromes c.

Pendant un séjour à Gif, dans le laboratoire du Professeur P. Slonimski, A. Sels avait pris une part active aux recherches qui conduisirent à la découverte et à l'isolement d'un noyau cytochrome c. Le cytochrome c de la levure, tel qu'il était décrit jusqu'alors, était en réalité un mélange de deux espèces moléculaires génétiquement distinctes mais très voisines; (elles ne diffèrent que par quelques acides aminés) les isocytochromes c (Iso-1 et Iso-2).

Tout comme la peroxydase, le cytochrome iso-2 apparaît rapidement, aux très faibles tensions d'oxygène et dès l'introduction de celui-ci; puisque la cycloheximide n'empêche pas son apparition, on est conduit à penser que le cytochrome iso-2 provient d'une protéine préformée, conclusion qui a d'ailleurs été confirmée par des expériences de marquage. L'autre cytochrome (iso-1) au contraire se forme par synthèse directe et complète à partir des acides aminés libres. Ces faits expérimentaux, complétés par une étude poussée de la cinétique d'induction et du comportement de divers mutants, conduisirent P. Slonimski à supposer que le précurseur protéique de l'iso-2-cytochrome c (son apoprotéine peut-être) serait le répresseur de la synthèse de tout le système respiratoire.

A. Sels et J. Zanen s'efforcent d'éprouver cette hypothèse. Ils ont étudié systématiquement les facteurs dont dépendent la formation du précurseur, sa conversion en hémoprotéine parfaite. Ils ont observé que le mutant cytoplasmique «petites colonies» incapable de faire le système respiratoire accumule plus de précurseur du cytochrome iso-2 que la levure normale. Ils s'efforcent à présent d'isoler l'apocytochrome c en éliminant l'hème par la méthode classique aux sels d'argent. Pour étudier les propriétés de répresseur de cette protéine, il faudra la faire pénétrer dans une cellule qui produit le système respiratoire. Peut-être l'apoprotéine sera-t-elle absorbée facilement par la levure intacte, puisque celle-ci absorbe et concentre le cytochrome c exogène, ainsi que Sels l'a montré jadis. Toutefois, les sphéroplastes pourraient être plus indiqués pour de tels essais.

D. Werbrouck a réussi à préparer des sphéroplastes de levure, à en isoler les mitochondries par centrifugation en gradient de densité dans un milieu osmotiquement protégé et elle a extrait de ces mitochondries des particules semblables à des ribosomes mais qui ne sont pas identiques aux ribosomes cytoplasmiques. Une méthode chromatographique de purification de mitochondries a été développée par M. Faurès; sa mise au point n'a toutefois pas été terminée, M. Faurès ayant quitté le laboratoire.

Enfin, A. Sels a recueilli un grand nombre de données utiles concernant la cinétique de l'oxydation des cytochromes par l'oxydase et par la peroxydase, il a mis au point une méthode permettant de doser côte à côte la catalase et la cytochrome peroxydase, et une nouvelle méthode d'extraction du cytochrome c dont le rendement est très supérieur à celui du procédé classique de Keilin.

## 5 — ACTION DE LA 8-AZAGUANINE SUR LA SYNTHÈSE DES RNA ET DES PROTEINES

### 5.1 — Introduction

Dès 1958, nous avons montré que la 8-azaguanine, qui s'incorpore dans des RNA de *B. cereus*, inhibe la synthèse des protéines. On pouvait espérer que la connaissance du mode d'action de cette substance, analogue typique de la guanine, donnerait des informations utiles sur la fonction de diverses classes de RNA, sur le contrôle réciproque de la synthèse des RNA

et des protéines, voire sur le code. Comme les effets de la fluoro-uracile, qui furent étudiés simultanément dans d'autres laboratoires, ceux de l'azaguanine sont multiples et assez complexes. Nous en avons analysé plusieurs aspects.

## 5.2 — Absence d'effets de l'azaguanine dans un tissu qui ne fait pas de RNA

Il est bien établi que des mutants bactériens incapables d'incorporer la guanine dans des nucléotides sont insensibles à l'azaguanine; pour exercer ses effets toxiques l'analogue doit donc s'incorporer dans des composés nucléotidiques à la place de la guanine. Puisque le GTP occupe, tout comme les RNA, une position particulière dans la synthèse des protéines, il fallait d'abord établir si l'inhibition de la synthèse des protéines était due à la formation d'Aza GTP ou à l'incorporation d'azaguanine dans des RNA (elle ne s'incorpore pas dans le DNA). On pouvait trancher cette question en voyant si l'azaguanine inhiberait la synthèse des protéines dans une cellule qui fait des protéines en absence de toute synthèse de RNA. Le réticulocyte était un matériel de choix : on savait, en effet, que l'azaguanine inhibe la synthèse de l'hémoglobine dans la moelle, dont les cellules font du RNA l'analogue inhiberait-il la synthèse de la même protéine dans les réticulocytes qui ne font pas de RNA? Marbaix montra que l'azaguanine est absorbée par les réticulocytes et transformée en nucléotides; il put en isoler et caractériser AGDP et AGTP; la synthèse de l'hémoglobine cependant n'est aucunement inhibée.

Ces expériences indiquent donc que ce n'est pas en se substituant à la guanine dans GTP que l'azaguanine inhibe la synthèse des protéines, mais en s'incorporant dans les RNA.

## 5.3 — Nature des RNA dans lesquels l'azaguanine s'incorpore

Quatre espèces de RNA au moins participent à la synthèse des protéines : les deux RNA ribosomiaux, les RNA de transfert et les RNA messagers. Il importait d'établir dans lesquels d'entre eux l'azaguanine s'incorpore. Les expériences de Mme Leclercq ont établi que l'azaguanine ne s'incorpore pas aux RNA ribosomiaux 16S et 23S, ni à aucun RNA capable de s'intégrer aux particules ribosomiales 30S et 50S. On trouve de l'azaguanine dans les RNA de transfert et dans des polynucléotides qui sédimentent en une large bande s'étalant de 10 à 40S. Le diagramme d'éluion de ceux-ci, lorsqu'on les chromatographie sur albumine méthylée, se superpose presque exactement à celui des RNA qui se marquent lorsqu'on donne du phosphate radioactif à la bactérie pendant un temps très court. Ils ressemblent donc à des RNA messagers, voire à des précurseurs de RNA ribosomiaux. Toutefois, contrairement aux messagers normaux, ils s'accumulent pendant des heures chez les bactéries soumises à l'action de l'azaguanine.

En ajoutant de l'actinomycine (qui bloque toute synthèse de RNA) ou de la guanosine (qui réduit fortement l'incorporation d'azaguanine) nous avons pu constater que les RNA accumulés se détruisent. L'analyse des résultats permet de conclure que ces RNA contenant de l'azaguanine se renouvellent continuellement, comme des messagers normaux, mais leur vie moyenne dépasse une demi-heure, alors que celle des messagers normaux n'est que de quelques minutes. Il était concevable cependant que certains de ces RNA fussent des RNA ribosomiaux dont la synthèse était interrompue à une étape de leur formation et qui, faute d'être intégrés dans des particules ribosomiales, étaient attaqués par des nucléases et détruits.

Alors qu'en présence d'azaguanine toute synthèse de RNA ribosomiaux cesse, on peut observer l'incorporation d'azaguanine dans des RNA ribosomiaux typiques qui s'intègrent d'ailleurs aux ribosomes si on ajoute de la guanosine à des bactéries qui ont incorporé l'analogue pendant une demi-heure au moins. Cette observation indiquait ou bien que certains des RNA accumulés en présence d'azaguanine s'étaient intégrés aux ribosomes, ou bien que des nucléotides azaguaniques provenant de la dégradation des RNA accumulés avaient été utilisés pour la synthèse de novo de RNA ribosomiaux typiques. Pour trancher, nous avons donné aux bactéries

du phosphate radioactif peu de temps après la guanosine, et étudié sa distribution parmi les nucléosides-3'-P obtenus par hydrolyse alcaline des RNA ribosomiaux. Cette recherche a montré que l'azaguanine présente dans ces RNA s'est réincorporée à partir du pool de nucléotides provenant de la dégradation des RNA accumulés en présence d'azaguanine; rien ne permet de penser (contrairement à ce que nous avons cru tout d'abord) que des fragments de RNA plus gros que des mononucléotides se soient intégrés aux RNA ribosomiaux.

Ces expériences montrent d'autre part que l'incorporation d'azaguanine dans les RNA ribosomiaux, en soi était possible; l'arrêt de synthèse des RNA ribosomiaux chez les bactéries auxquelles on donne de l'azaguanine n'est donc pas due à un blocage direct du processus de synthèse par les nucléotides de l'azaguanine, c'est plutôt un phénomène de régulation. Il ne s'explique pourtant pas par l'arrêt de la synthèse des protéines, car le chloramphénicol qui inhibe complètement celle-ci n'empêche nullement la synthèse des RNA ribosomiaux. L'azaguanine pourrait donc être un outil précieux dans l'étude de la régulation de la synthèse des RNA ribosomiaux qui est fort mal comprise; malheureusement aucune analyse génétique n'a été possible jusqu'ici chez *B. cereus*, et d'autre part, *E. coli* n'est pas sensible à l'azaguanine. Des mutants guanine-moins d'*E. coli* isolés par Mme Chantrenne-Van Halteren dans le but de faire incorporer de l'azaguanine à *E. coli* se sont révélés complètement réfractaires.

#### 5.4 — Inhibition sélective de la synthèse de certaines protéines

Dès 1958, nous avons observé que la 8-azaguanine n'inhibe pas au même degré la synthèse de toutes les protéines. En présence de petites quantités d'azaguanine, qui abaissent la vitesse de synthèse des protéines totales au tiers de sa valeur normale, l'activité de la pénicillinase ou de la catalase n'augmente plus.

Deux interprétations se présentent à l'esprit : ou bien l'azaguanine bloque la synthèse de certaines protéines en agissant sur leur système de régulation spécifique, ou bien la présence d'azaguanine dans les messagers provoque des erreurs ou des interruptions de la lecture, et les protéines formées sont anormales ou incomplètes et par conséquent dépourvues d'activité enzymatique.

Afin d'établir si c'est en agissant sur la régulation de la synthèse de la pénicillinase que l'azaguanine inhibe plus fortement la formation de cet enzyme que celle des polypeptides en général, Mme Leclercq a comparé le comportement d'un mutant constitutif à celui de la souche sauvage dans laquelle la pénicillinase est inductible.

Dans l'une et l'autre souche, la synthèse de pénicillinase est complètement supprimée dans des conditions où la synthèse de substances polypeptidiques (mesurée par l'incorporation de phénylalanine <sup>14</sup>C ou par dosage colorimétrique) n'est réduite qu'au tiers de sa vitesse normale. Il ne semble donc pas que le système de contrôle spécifique soit en jeu. C'est probablement au cours du processus de synthèse des polypeptides que des différences de sensibilité à l'analogie se manifestent; peut-être les protéines formées étaient-elles anormales.

J. Zanen a donc cherché à détecter une protéine anormale qui ressemblerait assez à la pénicillinase pour réagir avec un sérum antipénicillinase. Elle a utilisé dans ce but les techniques classiques d'immunodiffusion, immunoelectrophorèse, et de titration immunologique. Chez les bactéries traitées par l'azaguanine, elle n'a pu déceler la formation d'aucune protéine nouvelle capable de fixer l'anticorps antipénicilline. Ce résultat négatif montre que si une pénicillinase modifiée se forme, elle est si profondément modifiée qu'elle a perdu à la fois ses propriétés catalytiques et ses caractéristiques immunologiques.

Afin d'établir si la plupart des protéines sont profondément modifiées, J. Zanen et F. Péchère eurent alors recours à une méthode générale de fractionnement. Ils soumirent l'ensemble des protéines secrétées par la bactérie (parmi lesquelles se trouve la pénicillinase) à deux chromatographies successives. La résolution était bonne, on pouvait distinguer de nombreux pics bien séparés,

et notamment le pic très aigu de la pénicillinase. Les protéines formées en présence d'azaguanine ne se superposent pas aux protéines produites par la bactérie intacte, le pic de la pénicillinase et quelques autres ont disparu. Ces résultats confirment que plusieurs protéines bien caractérisées ne se forment plus. Les diagrammes ne révèlent l'apparition d'aucune protéine nouvelle qui formerait un pic bien séparé. Bien que ces expériences ne permettent pas de tirer des conclusions certaines, elles suggèrent que l'azaguanine provoquerait des accidents multiples lors de la traduction, en accroissant les chances d'erreur de lecture de certains codons.

### 5.5 — Lésions secondaires causées par la 8-azaguanine

L'inhibition générale (fût-elle partielle) de la synthèse des protéines s'exprime complètement 10 minutes après l'addition de l'azaguanine. A ce moment-là, elle est parfaitement réversible : l'addition de guanosine rétablit rapidement les synthèses et la croissance normale de la bactérie.

Mais si l'action de l'azaguanine se prolonge au-delà d'une heure, des lésions secondaires semblent se développer. Par exemple, si on ajoute de la guanosine une heure après l'azaguanine, la synthèse de pénicillinase se rétablit beaucoup plus tardivement que celle des substances protéiques en général; cette dissociation est fort nette. Nous en avons conclu qu'un élément du système qui fait la pénicillinase s'était détérioré.

Mme Leclercq a montré que ce phénomène se produit aussi bien chez la souche sauvage dont la pénicillinase est inductible que chez le mutant constitutif; il s'observe même si l'azaguanine agit dans des conditions où la synthèse de pénicillinase n'est pas induite. La détérioration ne dépend donc pas de l'état d'activité des centres de synthèse de la pénicillinase ni de l'accumulation de messenger de pénicillinase contenant de l'azaguanine.

A la lumière des expériences que nous avons rapportées plus haut concernant la réutilisation des nucléotides azaguaniques provenant de la destruction des messagers accumulés en présence d'analogie, nous pouvons maintenant proposer une interprétation simple de ces faits. Puisque la guanosine n'empêche pas complètement la réutilisation des nucléotides azaguaniques, on peut s'attendre à ce que les systèmes les plus sensibles à l'action directe de l'azaguanine apparaissent le plus profondément touchés lorsqu'on tente de lever l'inhibition par la guanosine et à ce que la restauration soit d'autant plus lente que la bactérie a accumulé de RNA contenant de l'azaguanine puisque la dégradation de ceux-ci fournira plus longtemps des nucléotides azaguaniques.

Les effets de l'azaguanine sur la synthèse des protéines en général et son action plus drastique sur la synthèse de certains enzymes peut donc s'expliquer par l'incorporation de l'analogie dans les RNA messagers. Mais la nature exacte des perturbations de la lecture qui en résultent n'est pas encore élucidée. Des travaux récents d'autres laboratoires étudiant *in vitro* des polynucléotides synthétiques contenant de l'azaguanine n'ont pas non plus conduit à une conclusion claire. Le problème s'est donc précisé; il n'est pas résolu.

## 6 — TRAVAUX EBAUCHES ET RECHERCHES OCCASIONNELLES

- Dans le but de déterminer la séquence terminale de nucléotides dans le RNA messenger des réticulocytes ainsi que dans les RNA ribosomiaux, un groupe de trois chercheurs, Mme de Henau-Kummert, J. Abraham et J. Temmerman s'efforcent d'adapter les méthodes existantes et de les perfectionner; deux modifications originales sont à l'étude en ce moment.
- Une première série de mutants thermosensibles affectés dans le système de synthèse des protéines ont été isolés par Mme Leclercq. Nous recherchons plus particulièrement des souches possédant des enzymes d'activation modifiés.

- La formation de protoplastes chez des bacilles résistant à la pénicilline et au lysozyme est étudiée par Mme Chantrenne; ce serait un pas vers l'isolement de mutants de ces bactéries.
- Divers acylphosphates substitués destinés à l'acylation artificielle de protéines ont été préparés par synthèse chimique.

A côté des recherches décrites plus haut, plusieurs travaux hors programme ont été exécutés par des visiteurs qui séjournèrent dans le laboratoire pour y apprendre une technique ou pour y trouver une aide.

C'est ainsi que M. Telerman a réussi à isoler pour la première fois des polyribosomes de muscle cardiaque, que J. Kraicer a mis en évidence les polyribosomes d'hypophyse de rat et montré qu'ils sont beaucoup plus abondants quand la glande produit l'ACTH que quand elle n'en produit pas, comme si la stimulation de l'hypophyse s'accompagnait de synthèse de messager.

G. Buyse séjournant au laboratoire pour y apprendre diverses techniques a mis au point une méthode nouvelle de dosage des lysolécithinases, basée sur l'emploi de lysolécithine tritiée.

J. Wérenne a réussi à isoler des polyribosomes intacts de sphéroplastes de levure.

De nombreux chercheurs belges ont appris dans le laboratoire les méthodes d'isolement de polyribosomes et les divers types d'analyse chromatographique utilisés pour la séparation de protéines, d'acides nucléiques et de leurs fragments.

## 7 — PUBLICATIONS

### *Symposium on Protein Biosynthesis : Concluding Remarks.*

H. CHANTRENNE : in Protein Biosynthesis, pp. 383-390 (R. Harris Ed.) Academic Press New York (1961).

### *Effects of 8-Azaguanine on the Specificity of Protein Synthesis in B. cereus.*

H. CHANTRENNE : Biological Structure and Function (T.W. Goodwin & O. Lindberg Ed.) Vol. I, pp. 281-287 (1961). Academic Press, London.

### *The Biosynthesis of Proteins.*

H. CHANTRENNE : Pergamon Press, Oxford (1961), 220 p.

### *Composition particulière d'un acide ribonucléique accumulé par B. cereus en présence d'azaguanine.*

H. CHANTRENNE : Arch. int. Physiol. Bioch., 69, pp. 745-746 (1961).

### *Sur la synthèse possible de pénicillinase anormale sous l'influence de la 8-azaguanine.*

J.F. PECHERE et J. ZANEN : Arch. int. Physiol. Bioch., 69, pp. 753-754 (1961).

### *Dosage des hémoprotéines chez la levure. I. Catalase.*

A. SELS : Arch. int. Physiol. Bioch., 70, pp. 161-162 (1962).

### *Dosage des hémoprotéines chez la levure. II. Cytochrome c peroxydase.*

A. SELS : Arch. int. Physiol. Bioch., 70, pp. 163-164 (1962).

### *Mode d'action de l'azaguanine sur la synthèse des acides nucléiques et des protéines chez B. cereus.*

H. CHANTRENNE : Colloques intern. CNRS, 106, pp. 465-473 (1962).

### *Aspects of the Biosynthesis of Enzymes.*

H. CHANTRENNE : Advances in Enzymology, 24, pp. 1-33 (1962).

- Possible production of several exopenicillinases by B. cereus.*  
J.F. PECHERE et J. ZANEN : Nature, 195, pp. 805-806 (1962).
- Incorporation de phosphore radioactif dans les acides ribonucléiques des réticulocytes de lapin, in vitro.*  
A. BURNY : Arch. int. Physiol. Bioch., 70, pp. 742-743 (1962).
- Dosage des hémoprotéines chez la levure. III. Chaînes de la succinoxydase.*  
A. SELS : Arch. int. Physiol. Bioch., 70, pp. 759-760 (1962).
- Dosage des hémoprotéines chez la levure. IV. Cytochrome oxydase.*  
A. SELS : Arch. int. Physiol. Bioch., 70, pp. 760-762 (1962).
- Sur les protéines basiques des réticulocytes de lapin.*  
L. UTJAN : Arch. int. Physiol. Bioch., 70, pp. 762-763 (1962).
- Information in Biology.*  
H. CHANTRENNE : Nature, 197, pp. 27-30 (1963).
- On the mode of action of azaguanine on protein synthesis.*  
H. CHANTRENNE : Pontif. Acad. Scientiarum Scripta Varia, 22, pp. 25-38 (1962).
- Secondary effect of 8-azaguanine on the induced or constitutive synthesis of penicillinase in B. cereus.*  
H. CHANTRENNE and M. LECLERCQ-CALINGAERT : Biochim. Biophys. Acta, 72, pp. 87-91 (1963).
- Action des ions cuivriques sur l'utilisation du glucose, des réserves et de l'acétate.*  
A. ANTOINE : Biochim. Biophys. Acta, 74, pp. 351-358 (1963).
- Incorporation de  $^{32}P$  dans les acides ribonucléiques de réticulocytes de lapin.*  
A. BURNY et H. CHANTRENNE : Biochim. Biophys. Acta, 80, pp. 31-38 (1964).
- Influence des ions manganèse sur la synthèse induite de cytochrome oxydase chez Saccharomyces cerevisiae.*  
G. BARBÉ : Arch. int. Physiol. Bioch., 72, pp. 310-311 (1964).
- L'action de la streptomycine sur les ribosomes d'E. coli.*  
A. HERZOG : Arch. int. Physiol. Bioch., 72, pp. 326-327 (1964). (En collaboration avec le laboratoire de Génétique).
- Synthèse d'azaguanosine triphosphate à partir d'azaguanine par les réticulocytes de lapin.*  
G. MARBAIX : Arch. int. Physiol. Bioch., 72, pp. 332-334 (1964).
- Sur l'isolement des mitochondries de Saccharomyces cerevisiae.*  
M. FAURÈS et J. GOBERT : Arch. int. Physiol. Bioch., 71, pp. 814-815 (1963).
- An effect of streptomycin on the dissociation of Escherichia coli 70S ribosomes.*  
A. HERZOG : Biochim. Biophys. Res. Com., 15, pp. 172-176 (1964). (En collaboration avec le laboratoire de Génétique).
- Separation of the messenger RNA of reticulocyte polyribosomes.*  
G. MARBAIX et A. BURNY : Biochem. Biophys. Res. Com., 16, pp. 522-527 (1964).
- Pituitary polysomes and adrenocorticotropin secretion.*  
J. KRAICER : Biochim. Biophys. Acta, 87, pp. 701-704 (1964).

*Sur l'emploi de l'actinomycine et de la proflavine pour étudier le renouvellement de l'acide ribonucléique.*

H. CHANTRENNE : Arch. int. Physiol. Bioch., 72, pp. 680-681 (1964).

*Effets de la ribonucléase sur les ribosomes de réticulocytes de lapin.*

G. MARBAIX et A. BURNY : Arch. int. Physiol. Bioch., 72, pp. 689-691 (1964).

*Changes in Patterns of Nucleic acid and Protein Synthesis caused by a Purine Analogue.*

H. CHANTRENNE : J. Cell Comp. Physiol., suppl. I, 64, pp. 149-164 (1964).

*Quelques propriétés de l'acide ribonucléique messenger isolé des réticulocytes de lapin.*

A. BURNY et G. MARBAIX : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 141-142 (1964).

*Sur l'inactivation thermique de l'isoleucyl-ARN synthétase.*

H. GROSJEAN et G. de VRIES : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 145-147 (1964).

*Liaison entre la lipogénèse et la formation de l'appareil respiratoire chez la levure.*

G. BARBE : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 136-137 (1964).

*Altération du comportement des ribosomes à la suite d'une mutation supersuppresseur.*

A. BOLLEN et A. HERZOG : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 139-141 (1964). (Avec le laboratoire de Génétique).

*On the use of actinomycine for observing the turnover of RNA.*

H. CHANTRENNE : Biochim. Biophys. Acta, 95, pp. 351-353 (1965).

*Isolement du RNA messenger des réticulocytes de lapin.*

A. BURNY et G. MARBAIX : Biochim. Biophys. Acta, 103, pp. 409-417 (1965).

*Comparaison des phospholipides des fractions mitochondriales isolées de levure normale et de « petites colonies ».*

G. BARBÉ : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, p. 522 (1965).

*Comparaison des protéines ribosomiales de divers tissus du lapin.*

C. GODFROID : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 525-526 (1965).

*Extraction du cytochrome c de tissus musculaires par autolyse douce.*

A. SELS et J. ZANEN : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 532-533 (1965).

*Effet de la proflavine sur les ARN de transfert.*

J. WERENNE et H. GROSJEAN : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 537-538 (1965).

*Altération du comportement des ribosomes à la suite d'une mutation supersuppresseur. III. Etude électrophorétique des protéines ribosomiales.*

A. BOLLEN, A. HERZOG et R. THOMAS : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 557-558 (1965). (Avec le laboratoire de Génétique).

*Interaction de la proflavine avec les ARN de transfert.*

H. GROSJEAN et J. WÉRENNE : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 561-562 (1965).

*Demonstration of functional polyribosomes in nucleate and anucleate fragments of sea-urchin eggs following parthenogenetic activation.*

A. BURNY, G. MARBAIX, J. QUERTIER et J. BRACHET : Biochim. Biophys. Acta, 103, pp. 526-528 (1965). (Avec le laboratoire de Morphologie animale et L.I.G.B., Naples).

- Effets de l'hydroxylamine sur la capacité acceptrice des acides ribonucléiques de transfert.*  
G. de VRIES et H. GROSJEAN : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 524-525 (1965).
- Altération du comportement des ribosomes à la suite d'une mutation « supersuppresseur ». II. Etude sur les ribosomes 70S purifiés.*  
A. HERZOG et A. BOLLEN : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 526-527 (1965).
- Isolement de l'ARN messenger des réticulocytes de lapin.*  
H. CHANTRENNE, A. BURNY et G. MARBAIX : Bull. Soc. Chimie Biol., 47, pp. 1565-1566 (1965).
- Effets de l'hydroxylamine sur la structure secondaire de l'ARN soluble.*  
G. de VRIES : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 867-868 (1965).
- Etude électrophorétique des protéines ribosomiales de foie et de réticulocytes de lapin.*  
C. GODFROID : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 870-874 (1965).
- A propos de la composition en bases de l'ARN messenger de réticulocytes de lapin.*  
G. MARBAIX, A. BURNY et G. HUEZ : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 874-875 (1965).
- Inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines par la proflavine chez la levure.*  
J. WÉRENNE : Arch. int. Physiol. Bioch., 73, pp. 877-878 (1965).
- Les polyribosomes, agents de la synthèse des protéines.*  
H. CHANTRENNE : Arch. Biol., 76, pp. 307-316 (1965).
- Isolation of messenger RNA from rabbit reticulocytes and study of some of its properties.*  
C. MARBAIX, A. BURNY et H. CHANTRENNE : Abstracts. 2d Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc. Vienna 1965, p. 284.
- Base composition of messenger RNA from rabbit reticulocytes.*  
G. MARBAIX, A. BURNY, G. HUEZ et H. CHANTRENNE : Biochim. Biophys. Acta, 114, pp. 404-406 (1966).
- Action de la 8-azaguanine sur la synthèse de pénicillinase chez B. cereus.*  
J. ZANEN et J.F. PÉCHÈRE : Biochim. Biophys. Acta, 123, pp. 172-180 (1966).

## 8 — TITRES ACADEMIQUES

Le Prix Francqui a été attribué au Professeur Chantrenne en 1963.

Le Professeur Chantrenne a été nommé :

- en 1964, Président de la Société Belge de Biochimie.
- en 1965, Président du Fund Committee d'Embo et membre du Conseil d'Embo.
- en 1966, membre de la IX<sup>ème</sup> Commission du F.N.R.S.

Le Prix Stas-Spring a été décerné à A. Sels, en 1963, par l'Académie Royale des Sciences, des Lettres et des Beaux-Arts de Belgique et la Société Chimique de Belgique.

En juin 1963, A. Sels a été Premier Lauréat du Concours de Bourses de voyage du Gouvernement, groupe Sciences chimiques.

## 8.1 — Thèses de doctorat

Ont défendu une thèse de doctorat :

- J. GOBERT (février 1963),
- P. CAMMERMAN (octobre 1963),
- J. ZANEN (décembre 1964),
- J. BARBE (novembre 1965),
- A. BURNY (janvier 1966),
- G. MARBAIX (février 1966),
- G. de VRIES (janvier 1967).

## 8.2 — Stages à l'étranger

G. MARBAIX a séjourné deux semaines au laboratoire de Zoologie expérimentale de l'Université de Lyon (Prof. V. Nigon) (mai 1963).

G. MARBAIX et A. BURNY ont fait un stage de six semaines (mars-avril 1965) au laboratoire d'Embryologie Moléculaire du L.I.G.B., à Naples (Prof. Brachet).

A. SELS a séjourné au laboratoire de Génétique physiologique du C.N.R.S., à Gif s/Yvette (France) :

- d'octobre 1962 à décembre 1963,
- en mai 1964,
- en décembre 1966.

*Conférences, Symposia et Cours du Professeur H. Chantrenne*

### En 1961 :

- Semaine d'étude sur les macromolécules biologiques (Académie Pontificale, Vatican).
- Colloque sur l'acide désoxyribonucléique, à la Société de Chimie physique de France (Coldevera).
- Colloque sur les acides ribonucléiques et les polyphosphates (Strasbourg).

### En 1962 :

- Colloque sur l'Information en Biologie (Royaumont, France).

### En 1963 :

- Ecole d'été de Biologie Moléculaire, à Ravello (Italie).
- Conférence à la Société de Chimie Biologique, à Paris.
- Conférence à l'Institut de Biologie physico-chimique, à Paris.

### En 1964 :

- Symposium on Molecular Activation of Mutagenic Agents, à Oak Ridge (USA).
  - Symposium de Cytologie Moléculaire André Vésale, à Bruxelles.
- Conférences à Marseille, New York et Philadelphie.  
Deux réunions Embo à Genève.  
Organisation de démonstrations dans le cadre du cours EURATOM à Bruxelles.

**En 1965 :**

Conférences à :

- Paris (Institut de Chimie Biologique),
- l'Université de Glasgow,
- Mol (C.E.N.),
- Saclay (C.E.A.),
- au Nat. Inst. Med. Research, Mill Hill, Londres.

Colloque sur la photosynthèse à Gorsem.

Trois réunions EMBO (Genève, Cambridge et Hanovre).

**En 1966 :**

Conférences à :

- Lima (Pérou) à l'Université San Marcos (Ecole d'été de Biochimie),
- Leiden (Pays-Bas),
- Lunteren (Colloque sur Regulation of nucleic acid and protein biosynthesis).

Participation à l'organisation du cours d'été EURATOM à Bruxelles.

*Conférences, Symposia et Cours*

H. GROSJEAN et J. ZANEN ont assisté au « First Meeting of the Federation of European Biochemical Societies » (Londres, 23-25 mars 1964).

A. BURNY, G. MARBAIX, H. GROSJEAN, J. ZANEN, G. de VRIES et S. KUMMERT ont assisté au « Cinquantenaire de la Société de Chimie Biologique » (Paris, 6-9 avril 1964).

En avril 1965, A. BURNY et G. MARBAIX ont assisté au II<sup>e</sup> Meeting de la « Federation of European Biochemical Societies », à Vienne.

G. de VRIES et A. SELS ont assisté à la « Vereniging van de Biochem. Maatschappij », à Wageningen, (Pays-Bas) (mai 1965).

Du 18 au 23 janvier 1965 et du 3 au 8 octobre 1966, A. SELS a participé aux Colloques sur la Régulation de la synthèse des isocytchromes c chez la levure, à Gif s/Yvette (Laboratoire de Génétique physiologique, C.N.R.S.).

G. de VRIES et G. BUYSE ont assisté à la réunion de la Société de Biochimie de Londres, en décembre 1965.

A. BURNY, G. MARBAIX et H. HUEZ ont participé à l'enseignement dans le cadre du 1<sup>er</sup> Cours d'été de la Fed. Europ. of Biochem. Soc. (Louvain, 1965).

Ont participé à l'enseignement dans le cadre du cours d'été Euratom, à Bruxelles, en septembre 1966 :

A. BURNY, G. MARBAIX, G. HUEZ, H. GROSJEAN, J. WERENNE, A. SELS, G. de VRIES, M. LECLERCQ et S. de HENAU.

Laboratoire de Biophysique et Radiobiologie  
par M. ERRERA

Durant les cinq années au cours desquelles le laboratoire a bénéficié du contrat Euratom-U.L.B., l'effort s'est porté essentiellement sur trois groupes de problèmes :

- 1° Les premières étapes de la synthèse du RNA (cellules de mammifères en culture).
- 2° La différenciation des hématoblastes des aires vasculaires de l'embryon de poulet.
- 3° L'étude du DNA de microorganismes (bactéries et virus) par microscopie électronique et essais d'autoradiographie moléculaire.

D'une manière générale, le Groupe a développé intensivement depuis 1963 l'utilisation du microscope électronique pour l'observation directe de macromolécules et a, d'autre part, étudié les divers problèmes cités, tant du point de vue fondamental que du point de vue radiobiologique.

**1 — PREMIERES ETAPES DE LA SYNTHÈSE DU RNA  
DANS LES CELLULES DE HeLa**

Prof. P.R. Srinivasan (1961) Boursier de la National Science Foundation.

Dr. M. Hill (1963-1964) Boursier de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (Vienne).

Prof. D. Kanazir (1964-1965) Contrat National Institutes of Health.

Prof. A.G. Levis (1965-1966) Boursier NATO, (1966-1967) Boursier EURATOM.

Mme Boudnitskaya (1963) Accords culturels avec l'URSS.

Mme A. Miller-Faurès.

Melle M. Brunfaut.

Mme D. Szapary-Winckelmans (depuis 1962).

M. V. Krsmanovitch (depuis 1962).

Les observations faites antérieurement au contrat, en collaboration avec R.P. Perry, avaient montré qu'une micro-irradiation du nucléole entraîne une chute considérable (environ 70 %) de la synthèse du RNA cytoplasmique : ceci indiquait clairement une relation entre cette partie des noyaux cellulaires et les ribosomes qui contiennent la majeure partie du RNA cytoplasmique. Il devenait dès lors important de préciser un certain nombre de points concernant, d'une part, la transcription du RNA sur le modèle du DNA et, d'autre part, le transfert du RNA formé vers le cytoplasme.

Avec la collaboration du Dr. P.R. Srinivasan, des marquages courts (2 à 10 minutes) des cellules de HeLa à l'aide de précurseurs du RNA marqués au  $^{14}\text{C}$  ou au  $^3\text{H}$  ont montré qu'environ 50 % du RNA synthétisé dans le noyau est transféré vers le cytoplasme en 1 à 2 heures (1).

Des analyses de nucléotides du RNA marqués au  $^{32}\text{P}$  ont montré que le RNA qui quitte le noyau est plus riche en adenine (A) et en uracile (U) que celui qui y reste plus longtemps et dont la composition en bases est semblable à celle du RNA ribosomal (2, 3). Ceci nous a permis de suggérer dès 1961 que cet RNA plus riche en adénine et uracile qui quitte rapidement le noyau pourrait être un RNA messenger, ce qui est conforme aux expériences de Scherrer et Darnell, qui ont montré qu'un tel RNA apparaît rapidement dans les polysomes cytoplasmiques. En collaboration avec le Dr. M. Hill, nous avons d'ailleurs montré (1962) qu'une partie de la radioactivité du RNA qui se marque rapidement est retrouvée dans une fraction cellulaire lourde, sensible à la ribonucléase et active dans la synthèse des protéines (4, 5, 6). Il est également apparu que les sous-unités 30S des ribosomes marquées par des précurseurs du RNA apparaissaient plus rapidement dans le cytoplasme que les sous-unités 50S (7). Il est probable, comme l'ont suggéré indépendamment Spirin, Nirenberg et Gros, que le RNA messenger synthétisé dans le noyau en sort associé à des éléments précurseurs de ribosome.

D'ailleurs, les étapes intermédiaires entre la transcription des RNA et leur apparition dans le cytoplasme sous leur forme fonctionnelle (RNA messagers, de transfert et ribosomiaux) sont loin d'être comprises et c'est pour cette raison que nous nous sommes efforcés d'isoler le RNA «au cours de sa transcription» sous forme d'un complexe avec le DNA, qui pourrait servir de point de départ à l'étude du mécanisme de la formation des RNA «définitifs».

Nous avons pensé avec le Prof. Kanazir qu'il serait plus rationnel de faire synthétiser le RNA par des noyaux isolés dont le métabolisme devrait, en principe, être plus simple et plus facile à interpréter que celui des cellules entières, mais qui représentent un système plus physiologique que des systèmes *in vitro*. Bien que l'incorporation de précurseurs dans le RNA de noyaux isolés soit beaucoup plus faible que dans des cellules entières, nous avons pu isoler par chromatographie sur albumine méthylée un complexe de DNA-RNA (associé à quelques % de protéines), qui se sature en précurseur marqué après une quinzaine de minutes d'incubation; il se forme des RNA s'éluant à plus faible concentration saline (RNA «solubles»), mais nous n'avons pas détecté de RNA s'éluant à forte concentration saline (RNA ribosomiaux ou RNA précurseurs de ceux-ci) (8). Le RNA associé au DNA est très hétérogène et de poids moléculaire pouvant aller de 30 000 à 500 000 (9).

Les bases puriques et pyrimidiques étant en proportions très anormales, il nous a paru ensuite plus intéressant de concentrer nos efforts sur le même type de complexe DNA-RNA isolé à partir de cellules entières incubées pendant des temps brefs (30 minutes au maximum).

Si du  $\text{P}^{32}$  est utilisé comme précurseur et que les cellules sont traitées à l'alcool isoamylique et au chloroforme en présence de dodécylsulfate de Na, on peut précipiter le DNA sous forme fibreuse par de l'éthanol, en même temps qu'une certaine proportion de RNA. L'observation du matériel analysé sur colonne d'albumine méthylée révèle qu'une forte proportion de la radioactivité est éluee aux mêmes concentrations salines que le DNA; dans cette même région, environ 30 % du  $^{32}\text{P}$  est sous forme alcalilabile et contient la proportion suivante de bases puriques et pyrimidiques : A = 29,4; U = 31,4; G = 17,0; C = 22,3; ceci indique donc la présence d'un RNA dont les bases sont dans des proportions rappelant celles du DNA.

Si de l'uridine  $^3\text{H}$  est utilisée comme précurseur, on observe un profil d'éluion de la radioactivité légèrement différent de celui obtenu après un marquage au  $^{32}\text{P}$  : il y a souvent un pic précédant immédiatement le DNA (I), un léger plateau au niveau du DNA (II) et la persistance d'une radioactivité nette dans la région s'éluant immédiatement après le DNA.

Si on étudie la cinétique du marquage au cours du temps, on observe que le RNA des régions I et II se sature assez rapidement en précurseur radioactif (10-15 minutes) et que celui de la région III continue à se marquer linéairement comme les RNA de faible poids moléculaire ou ceux de poids moléculaire plus élevé (RNA des ribosomes et précurseurs et, vraisemblablement, une certaine proportion du RNA dit «rapidement marqué»), mais il pourrait s'agir là d'une contamination par ces derniers. Nous n'avons pu déceler aucune différence significative de la proportion des bases des RNA des trois régions (I, II, III), toujours du type A-U.

Toutefois, même en utilisant de l'uridine 5-<sup>3</sup>H, on observe que jusqu'à 20 % du DNA devient radioactif pour l'ensemble de ces 3 régions. De l'ordre de 25 % du RNA s'éluant dans l'ensemble des 3 régions reste associé au DNA dans un gradient de Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le restant s'équilibrant dans le gradient entre le DNA et les RNA ribosomiaux, probablement dans une zone de densités sensiblement plus légères que les RNA de faible poids moléculaire. Nous avons estimé à 3 à 5 % la quantité de RNA total (ensemble des 3 régions) résistant à la RNAase et restant associé au DNA dans un gradient de Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Il nous paraît donc possible d'isoler une très petite proportion du RNA cellulaire (de l'ordre de quelques %), se marquant en 30 minutes, qui est associé au DNA et présente certains caractères d'un hybride DNA-RNA, notamment en ce qui concerne sa composition en bases qui rappelle celle du DNA, sa résistance à la ribonucléase et sa persistance en milieu à haute force ionique.

Enfin, les diverses régions du gradient de la colonne d'albumine ont été analysées au microscope électronique. Les régions des RNA de faible poids moléculaire ne contiennent aucune fibre rappelant les images du DNA classique; au contraire, les régions I, II, III sont essentiellement constituées de telles fibres; de plus, dans un certain nombre d'expériences, la fraction I contient des fibres comportant des renflements d'environ 50 Å de diamètre et assez régulièrement espacés. Le fait qu'on ne trouve que peu de petites molécules parmi les fibres du DNA plaide en faveur de l'idée que le RNA lui est intimement associé (10). Une petite proportion de DNA est éluee avec les RNA ribosomiaux.

### 1.1 — Synthèse du RNA au cours du cycle mitotique

Les observations radioautographiques ont permis de préciser qu'au début de la prophase de la mitose il y a une libération assez massive de RNA dans le cytoplasme, mais, dès la télophase, lors de l'apparition de nucléoles très basophiles, leur faible radioactivité permet de supposer que ces organites pourraient être constituées à partir de RNA déjà présent avant la mitose et de RNA dont la transcription aurait lieu dès la télophase (6).

### 1.2 — Aspects radiobiologiques du métabolisme du RNA

Les diverses étapes du métabolisme du RNA consécutives à la transcription étant encore mal débrouillées, nous avons limité le travail radiobiologique à un certain nombre d'expériences autoradiographiques qui devront par la suite être précisées par des méthodes biochimiques; les résultats peuvent se résumer de la manière suivante (11, 12) :

- a) Si on irradie des cellules dont le RNA a été marqué préalablement, ce RNA est d'autant plus radiosensible que le marquage a été bref : il est vraisemblable que le RNA qui a quitté sa matrice de DNA et qui n'est pas encore dans son état définitif (RNA rapidement marqué) est le plus radiosensible.
- b) Si on donne un précurseur du RNA à des cellules irradiées, la diminution de la vitesse de synthèse du RNA est d'autant plus forte que l'incubation est brève, ce qui indique que la transcription du RNA est radiosensible, mais que cette radiolésion est assez rapidement restaurée. Le nucléole paraît être plus radiosensible que le reste du noyau : il semble effectivement, comme cela a été montré dans d'autres laboratoires, que la synthèse des RNA ribosomiaux (surtout celui de constante de sédimentation 28 S) soit plus radiosensible que celle de RNA de plus faible poids moléculaire.

Il n'est pas impossible que, dans des conditions particulières, notamment au cours de la différenciation cellulaire où il est important que le « programme » de la synthèse des RNA soit

rigoureusement respecté, une partie tout au moins de la radiosensibilité des cellules dépend d'une transcription anormale de RNA.

c) Le transfert de RNA du noyau vers le cytoplasme est également, du moins dans une certaine mesure, un processus radiosensible.

## 2 — DIFFERENCIATION DES HEMATOBLASTES DES AIRES VASCULAIRES DES EMBRYONS DE POULET

(Mlle A. Hell)

Le problème de la différenciation cellulaire reste, à l'heure actuelle, l'énigme fondamentale de la biologie : c'est de nos connaissances des mécanismes qui y président que dépend l'un des problèmes radiobiologiques essentiels : pourquoi les cellules ou les organismes en voie de différenciation sont-ils beaucoup plus sensibles à toute une série d'agents (y compris les radiations) que lorsqu'ils ont atteint le stade différencié? Il est clair qu'il sera impossible de répondre à cette question sans avoir d'abord compris ce qui se passe dans des conditions normales. Le problème fondamental est donc de savoir comment se débloque l'information spécifique du type de cellule étudié. Nous avons pensé que les érythroblastes de l'aire vasculaire de l'embryon de poulet pourraient fournir un matériel expérimental permettant de contribuer à répondre à cette question, car le test de la différenciation est très facilement mesurable (« synthèse nette » de l'hémoglobine) et que, d'autre part, les cellules continuant à se multiplier sur un milieu de culture simple, il est permis d'espérer qu'il sera un jour possible de les cultiver en suspension et de tâcher d'induire ou de réprimer spécifiquement la synthèse de l'hémoglobine.

Le travail réalisé a consisté en la mise au point de microméthodes de dosage de l'hémoglobine, des protéines totales et des acides nucléiques des aires vasculaires cultivées *in vitro* et, ensuite, d'étudier la séquence de ces différents processus dans des conditions normales et en présence d'agents connus pour perturber le métabolisme des acides nucléiques et des protéines. Les blastodisques sont prélevés, sur des œufs incubés à 37 °C, au moment où on n'observe qu'un seul, quatre, sept ou dix somites et ils sont mis en culture pendant 24 heures, au cours desquelles on peut doser les acides nucléiques et les protéines. Normalement, l'hémoglobine ne commence à devenir dosable qu'au stade de 10 somites, mais il s'en forme une quantité appréciable après 24 heures de culture — même dans les blastodisques prélevés aux stades les plus jeunes.

Dans le but de mieux comprendre le système et de déterminer la corrélation existant entre la transcription du message et la formation des protéines spécifiques, nous avons soumis les explantats, immédiatement après leur mise en culture, aux rayons X (2 000 r) et à la Bromodeoxyuridine (BUDR), dans l'espoir d'inhiber ou d'altérer spécifiquement la synthèse du DNA, à l'actinomycine D et à l'Azaguanine pour tâcher d'inhiber spécifiquement celle du RNA : en fait, chaque agent utilisé inhibe à la fois les deux types d'acides nucléiques, mais dans des proportions différentes.

Les conclusions suivantes peuvent se dégager du travail (13, 14, 15) :

- a) il existe un parallélisme d'inhibition entre la synthèse des RNA et celle de l'hémoglobine, mais la synthèse de l'ensemble des protéines est également inhibée, souvent même plus que celle de l'hémoglobine;
- b) la synthèse de l'hémoglobine peut se poursuivre, en dépit de lésions profondes des chromosomes observées principalement après irradiation X des blastodisques;
- c) une étude autoradiographique à l'aide de thymidine <sup>3</sup>H montre que les hématoblastes des aires vasculaires continuent à se diviser (un peu plus de 2 fois en 24 h), tandis que l'ectoderme et l'endoderme régressent pendant la synthèse de l'hémoglobine;

- d) quand la synthèse de RNA est totalement bloquée, de l'hémoglobine peut encore être formée; ce qui prouve l'existence d'une certaine latence entre transcription et traduction du message génétique : les expériences faites à l'aide d'actinomycine D permettent d'estimer à une dizaine d'heures la durée de vie du RNA messenger; d'autre part, elles démontrent clairement que l'information transcrite n'est pas exprimée immédiatement et ceci pose le problème de la forme sous laquelle est stockée cette information (une étude des polysomes de ces érythroblastes s'impose évidemment) et les mécanismes par lesquels elle est « débloquée » devront être précisés;
- e) une étude qualitative de l'hémoglobine synthétisée (électrophorèse, dénaturation alcaline) *in vitro* a ensuite été faite après mise au point d'une technique de centrifugation en gradient de ficoll permettant d'éliminer les cellules ecto et endodermiques.

Une hémoglobine embryonnaire est synthétisée *in vitro* en même temps que de l'hémoglobine adulte et les rayons X, la BU DR et l'actinomycine ne semblent pas provoquer la synthèse d'hémoglobines anormales et affectent davantage l'hémoglobine qui se synthétise le plus tardivement (16).

L'ensemble de ces résultats concordent avec ceux obtenus par Wilt.

### 3 — ETUDE DU DNA DE MICROORGANISMES (bactéries et virus)

Mme Miller-Faurès, Mme Brachet-Jaffé (depuis 1963), Melle Bourguignon (depuis 1962),  
Melle Scheurs (1963-1964)

Il nous a semblé important que l'étude du DNA par les méthodes physicochimiques classiques soit complétée par des méthodes permettant l'observation de macromolécules individuelles. Deux méthodes s'avèrent possibles a priori : l'observation autoradiographique de molécules individuelles et, si possible, intactes, ou l'observation directe à l'aide du microscope électronique. Ce type d'observation devrait permettre, entre autres, le contrôle d'hypothèses fondamentales comme celles concernant le mécanisme d'insertion du DNA d'un bactériophage dans le DNA d'une bactérie lysogène ou, comme l'a fait Cairns, l'étude du mécanisme de la répllication du DNA. D'autre part, ce mode d'investigation devrait rendre de grands services dans l'étude des mécanismes d'action sur le DNA d'une série d'agents mutagènes, comme certaines substances chimiques ou les divers types de rayonnements.

#### 3.1 — Etude autoradiographique de DNA de *E. Coli* et de phage $\lambda$ par la méthode de Cairns

En dépit d'observations préliminaires très prometteuses (17) qui nous ont permis de vérifier d'une manière générale les observations de Cairns, nous avons éprouvé de grosses difficultés (comme d'autres laboratoires d'ailleurs) pour obtenir des préparations reproductibles; une série infructueuse d'essais systématiques des conditions de lyse des bactéries n'a jamais permis le déroulement que d'une faible proportion de chromosomes de *E. coli* et de très nombreuses expériences ont été totalement négatives. Il est probable qu'une meilleure connaissance du mode d'association du DNA aux membranes bactériennes permettra d'aborder le problème avec davantage de succès.

En ce qui concerne le DNA de bactériophage  $\lambda$ , des molécules d'environ 16  $\mu$  ont été observées par autoradiographie. Dans ce cas-ci, la dimension du DNA permet l'observation de molécules individuelles et intactes par le microscope électronique.

Nous nous proposons, dans un avenir proche, d'associer les deux techniques d'observation (autoradiographie et microscopie électronique) qui devraient permettre l'étude directe de molécules hybrides.

### 3.2 — Etude du DNA de virus par microscopie électronique

On sait qu'il est possible d'obtenir des molécules de DNA qui, dans le cas de certains virus, ont un poids moléculaire identique à celui d'un chromosome viral. C'est pourquoi nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier ces DNA par microscopie électronique. Une méthode de préparation de grandes quantités de bactériophage  $\lambda$  a été mise au point. Le DNA, après extraction au phénol, a été observé au microscope électronique suivant la technique de Kleinschmidt. Le DNA se présente sous forme de filaments de 15-17  $\mu$ , ouverts ou fermés; l'agitation mécanique violente ouvre les molécules circulaires et ensuite les fragments approximativement en 1/2 et 1/4 de molécules, ce qui confirme des observations de Hershey basées sur l'étude des poids moléculaires.

*Courbes de dénaturation thermique* : du DNA est chauffé pendant des temps brefs en présence de formaldéhyde, à des températures de plus en plus élevées, puis il est brusquement refroidi : on mesure d'une part la densité optique et, d'autre part, on observe l'échantillon correspondant au microscope électronique. La formaldehyde (2 % final) abaisse d'environ 10 °C la température de fusion (observée spectrophotométriquement) et, comme le montrent les images au microscope électronique, modifie déjà l'aspect des molécules à la température du laboratoire : on note que les filaments de DNA ont un aspect moins rigide : apparition de « points de rebroussement » où la double hélice semble se replier sur elle-même, ce qui pourrait se produire si des régions courtes (1 ou 2 paires de bases) sont dénaturées. Quelques degrés plus bas que la température à laquelle on commence à observer l'augmentation de la densité optique, on observe au microscope électronique l'apparition de « nœuds » (épaississements localisés) dont le nombre augmente au fur et à mesure de l'accroissement de la température. Ces nœuds résulteraient de l'existence de zones de dénaturation où les deux fibres de la double hélice s'emmêlent, leur renaturation à basse température étant empêchée par la présence de la formaldehyde.

Des expériences préliminaires ont montré qu'avant l'apparition des nœuds, la molécule commence à s'allonger (à vérifier), mais, dès qu'ils apparaissent, les fibres se raccourcissent progressivement. A partir d'une certaine température (avant le maximum de l'hyperchromie) les molécules s'emmêlent. L'allongement de la molécule précédant sa dénaturation avait été postulé à la suite de mesures du rayon de giration (Luzzati).

Le DNA de phage  $\lambda$  étant souvent difficile à observer au microscope électronique (car il est très long), nous avons pensé qu'il serait intéressant de faire des observations parallèles sur des molécules d'un DNA dix fois plus petit. Avec la collaboration du Dr. Bourgaux, nous avons confirmé les mêmes observations, à l'aide de DNA de virus de Polyoma, dont la longueur n'est plus que de 1,6  $\mu$ , ce qui permettra de passer à des grossissements microscopiques plus élevés après la mise au point (actuellement en cours) de méthodes de coloration des fibres. L'hypothèse qui a guidé cette partie du travail est la suivante : puisque la dénaturation du DNA débute dans des régions privilégiées, on peut supposer que celles-ci sont riches en liaisons A-T et, puisqu'on peut espérer partir de molécules intactes, on devrait trouver une constance dans la répartition des « nœuds » le long de la molécule : ceci pourrait être utile, notamment comme première étape de l'établissement de « séquences » des nucléotides. Un travail tout récent de Inman confirme cette hypothèse.

### 3.3 — Radiobiologie du DNA des microorganismes (Mme D. Krsmanovic-Simic, depuis 1966)

1. Si l'on commence à connaître de manière assez satisfaisante les effets chimiques et physico-chimiques des radiations ionisantes sur le DNA traité *in vitro*, les renseignements restent fragmentaires en ce qui concerne le DNA irradié *in vivo* dans une bactérie ou un virus, pour prendre les cas les plus simples.

Une première série d'expériences a consisté à irradier (rayons X) des bactéries *E. coli* — radiosensibles KMBL 237 et 146 —, fortement marquées par de la thymidine  $^3\text{H}$ , à isoler le DNA, à l'hydrolyser à l'aide d'acide formique concentré et à chromatographier l'hydrolysate en couche mince : actuellement, aucun dérivé anormal de la thymine n'a pu être mis en évidence par autoradiographie des chromatogrammes, mais les peroxydes qui pourraient se former sont probablement instables et le travail actuel n'est qu'à un stade préliminaire.

2. Une suspension de phage  $\lambda$  est irradiée (rayons X et UV) et immédiatement déprotéinée en présence de  $\text{NaClO}_4(5\text{M})$  pour l'observation au microscope électronique.

Pour des doses croissantes de rayons UV, on commence par observer un certain raccourcissement de molécules ( $13 \mu$  au lieu de  $16 \mu$ ); à doses plus fortes, les molécules de DNA ont un aspect réticulé (le DNA se déroule mal, probablement à la suite de pontages intramoléculaires), à des doses plus fortes encore, le bactériophage n'arrive plus à se débarrasser de son enveloppe protéique lors de l'action du perchlorate, ce qui indique vraisemblablement la formation de liaisons covalentes entre les protéines de la tête du bactériophage et le DNA. Des doses croissantes de rayons X provoquent une fragmentation des molécules en éléments de plus en plus petits. Il est possible que des cassures d'une seule fibre apparaissent également et ceci sera étudié par l'observation de molécules dénaturées.

Ce travail n'étant commencé que depuis le début de 1966, il ne comporte que des observations de nature qualitative; des observations de nature plus quantitative sont en cours.

3. Etude de l'effet létal de  $^{32}\text{P}$  ou de  $^{33}\text{P}$  incorporé dans le DNA du bactériophage  $\lambda$ .

Cet aspect de la radiobiologie du DNA est étudié par M<sup>lle</sup> M. Meert, sous la direction du Dr. R.K. Appleyard. Actuellement, le travail a essentiellement consisté dans l'obtention de stocks de phages de titre suffisamment élevé dans des milieux pauvres en phosphore, de manière à obtenir un maximum de radioactivité par particule virale.

L'énergie des électrons émis par le  $^{32}\text{P}$  et par le  $^{33}\text{P}$  étant très différente, la comparaison des deux types de suicide devrait permettre de préciser la nature de cet effet.

#### 4 — BIBLIOGRAPHIE

- 1 — P.R. SRINIVASAN, A. MILLER-FAURÈS, M. BRUNFAUT and M. ERRERA.  
Kinetics of pulse-labeling of ribonucleic acid in HeLa cells.  
*Biochim. Biophys. Acta* **72**, 209-216 (1963).
- 2 — P.R. SRINIVASAN, A. MILLER-FAURÈS et M. ERRERA.  
Isolation techniques for HeLa cell nuclei.  
*Biochim. Biophys. Acta* **65**, 501-505 (1962).
- 3 — P.R. SRINIVASAN.  
On the nature of the ribonucleic acids migrating from the nucleus to the cytoplasm in HeLa cells.  
*Biochim. Biophys. Acta* **61**, 526-529 (1962).
- 4 — D. WINCKELMANS, M. HILL et M. ERRERA.  
Ribosomes from HeLa cells.  
*Biochim. Biophys. Acta* **80**, 52-62 (1964).

- 5 — M. HILL, A. MILLER-FAURÈS et M. ERRERA.  
Studies on rapidly labelled ribonucleic acid in HeLa cells.  
*Biochim. Biophys. Acta* **80**, 39-51 (1964).
- 6 — M. ERRERA et M. BRUNFAUT.  
Observations of mitotic figures in pulse labelled HeLa cells.  
*Exper. Cell Res.* **33**, 105-111 (1964).
- 7 — M. BRUNFAUT et V. KRSMANOVIC.  
Cinétique de marquage des ribosomes de cellules de HeLa.  
*Arch. Internat. Physiol. Bioch.* **73** (1965).
- 8 — V. KRSMANOVIC, D. KANAZIR et M. ERRERA.  
A DNA-pulse labelled RNA complex from HeLa cell nuclei.  
*Biochim. Biophys. Acta* **103**, 544-548 (1965).
- 9 — V. KRSMANOVIC.  
Synthèse des acides ribonucléiques, *in vitro*, dans les noyaux isolés de cellules de HeLa.  
*Rev. Ferment. Ind. Alimentaires* **20**, 221 (1965),  
**21** (1966) 10 et 57.
- 10 — M. BRUNFAUT, D. SZAPARY-WINCKELMANS, A. MILLER-FAURÈS et M. ERRERA.  
Kinetics of RNA formation in HeLa cells.  
*Internat. J. of Radiation Biol.* (sous presse).  
«The Cell Nucleus», Taylor and Francis Ltd, London (1966) p. 79.
- 11 — E.V. BOUDNITSKAYA, M. BRUNFAUT et M. ERRERA.  
Effets des rayons X sur l'acide ribonucléique des cellules de HeLa.  
*Arch. Internat. Physiol. Bioch.* **71**, 810-811 (1963).
- 12 — E.V. BOUDNITSKAYA, M. BRUNFAUT et M. ERRERA.  
Effects of X-rays on RNA and RNA metabolism in HeLa cells.  
*Biochim. Biophys. Acta* **80**, 567-573 (1964).
- 13 — A. HELL.  
Effets de la 8-azaguanine sur la synthèse initiale de l'hémoglobine chez l'embryon de poulet.  
*Arch. Internat. Physiol. Bioch.* **71**, 817-818 (1963).
- 14 — A. HELL.  
The initial synthesis of haemoglobin in de-embryonated chick blastoderms. I. Metabolism of the blastodisc cultured *in vitro*.  
*J. Embryol. exp. Morph.* **12**, part 4, 609-619 (1964).
- 15 — A. HELL.  
The initial synthesis of haemoglobin in de-embryonated chick blastoderms. II. The effect of metabolic inhibitors on the blastodisc cultured *in vitro*.  
*J. Embryol. exp. Morph.* **12**, part 4, 621-632 (1964).
- 16 — A. HELL.  
La synthèse initiale de l'hémoglobine chez l'embryon de poulet.  
Thèse doctorat en sciences chimiques ULB 1965.
- 17 — M.F. BOURGUIGNON.  
Etude autoradiographique de molécules individuelles d'acide désoxyribonucléique de *Escherichia Coli*.  
*Arch. Internat. Physiol. Bioch.* **72**, 516-517 (1964).

## 5 — TITRES ACADEMIQUES ET SCIENTIFIQUES

M. Errera a été nommé :

- Professeur ordinaire et Titulaire de différents cours à l'Université libre de Bruxelles;
- Membre du Comité de Biophysique des Académies Royales et délégué de ce Comité à la Commission de Radiobiologie de l'International Union for Pure and Applied Biophysics;
- Chargé d'enseignement à l'Institut National des Sciences Techniques et Nucléaires (INSTN) — Saclay.

### 5.1 — Thèses de doctorat

Ont défendu une thèse de doctorat :

- A. Hell à l'Université libre de Bruxelles en 1965;
- V. Krsmanovic à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille en 1966.

### 5.2 — Déplacements

#### 5.2.1 — Stages à l'étranger :

On effectué un stage :

- aux Etats-Unis, dans le Laboratoire de Biochimie du College of Physicians and Surgeons de la Columbia University : M. Brunfaut, 1963-1964;
- en Italie, au Laboratoire International de Biophysique et de Génétique de Naples : D. Winckelmans, 1963-1965;
- en Israël, à l'Institut Weizman de Rehovoth : A. Hell, 1966.

#### 5.2.2 — Conférences, symposia, cours

M. ERRERA :

- Comité consultatif de la Recherche de l'Euratom (1961)
- Cours Rehovoth « Aspects biochimiques de la radiobiologie » (1962)
- « Biochemical Society », Cambridge (1962)
- Colloque « Cell Growth and Cell Division », Liège (1962)
- Réunion mixte Sociétés belge et française de Biochimie, Paris (1963)
- Cours NATO « Structure et fonctions des chromosomes », Istanbul (1963)
- 3<sup>e</sup> Erwin Baur Symposium « Structure et fonctionnement du gène », Gatersleben (1963)
- Réunion « Federation of European Biochemical Societies », Londres (1964)
- Conférences et visites de laboratoires en Chine (1964)
- Réunion « International Organization for Pure and Applied Biophysics », Paris (1964)
- Association des Radiobiologistes de l'Euratom, Col de Veza (1964)
- Molecular Biophysics Summer School, Squaw Valley (1964)
- Cours Euratom de biologie moléculaire, Bruxelles (1964)

- Réunion « International Organization for Pure and Applied Biophysics », Naples (1965)
- Cours Euratom « Biochemical Genetics », Naples (1965)
- Symposium « The Cell Nucleus », Rijswijk (1966)
- Symposium « Genetical aspects of radiosensitivity : mechanisms of repair », Vienne (1966)
- Congrès « Radiation Research », Cortina d'Ampezzo (1966)
- Enseignement radiobiologie « Agence Internationale de l'Energie Atomique », Vinça (1966)
- Congrès « International Organization for Pure and Applied Biophysics », Vienne (1966)
- Cours Euratom de biologie moléculaire, Bruxelles (1966)

A. HELL :

- Réunion « Federation of European Biochemical Societies », Londres (1964)
- Colloque « Biochemical Society », Cambridge (1965)

A. MILLER-FAURES :

- Laboratoire du Prof. Bernhart (Paris) : exposé et démonstration de microscopie électronique du Prof. Kleinschmidt (1965).

Laboratoire de Génétique  
par R. THOMAS

**1 — DEVELOPPEMENT DU LABORATOIRE DE GENETIQUE  
PENDANT LA DUREE DU CONTRAT**

Le laboratoire de Génétique s'est développé de manière extrêmement rapide au cours des cinq années du Contrat Euratom-U.L.B. Il occupait, au moment de l'entrée en vigueur du contrat (1961), quatre personnes :

- R. Thomas, chargé de cours;
- L. Lambert, technicienne;
- J. Noiset, préparateur;
- un chercheur étranger (L.H. Pereira da Silva, Brésil).

En ce début de l'année académique 1966-1967, l'effectif du laboratoire comprend :

- R. Thomas, Professeur ordinaire;
  - A. Herzog, Assistant;
  - M<sup>me</sup> M. Pisaneschi, Secrétaire (half-time);
  - M<sup>me</sup> L. Desmet et M<sup>lle</sup> D. Willems, Techniciennes;
  - J. Noiset, Préparateur;
  - 12 thésiens (en décomptant A. Herzog, déjà cité) :

|                     |               |
|---------------------|---------------|
| Ph. Brachet         | A. Bollen     |
| S. Mousset          | E. Maurer     |
| N. Lefèbvre-Douat   | P. Neerdaels  |
| J. Szpirer-Roscam   | A. Ghysen     |
| C. Dambly-Chaudière | C. Leurs      |
| M. Couturier-Thilly | A. Toussaint. |
  - 1 travailleur étranger (B. Green, Canada);
  - 1 chercheur libre (Dr. J. Manaster);
- soit au total 20 personnes, sans compter les mémoires de licence (5).

Ce développement rapide s'explique en partie par le fait que le Laboratoire est de création récente; néanmoins, un tel essor eût été absolument impossible, tant du point de vue financier que du point de vue des locaux, sans le contrat.

Le déménagement dans les nouveaux locaux s'est opéré pratiquement sans perte de temps, les conditions nouvelles permettent de travailler de manière infiniment plus efficace que par le passé. On peut en voir un témoignage dans l'accroissement sensible du taux de publication en 1966; on notera, en particulier, la part croissante des publications étendues et l'importance croissante des collaborations avec des laboratoires étrangers.

## 2 — ENONCE DES RESULTATS LES PLUS SAILLANTS

### 2.1 — Contrôle du développement des bactériophages tempérés

- Confirmation de notre résultat antérieur selon lequel la réplication du matériel génétique ne comporte pas le transfert obligé de l'ensemble de l'information génétique du DNA à une structure non désoxyribonucléique.
- Mise en évidence d'une nouvelle fonction précoce (x) dont le déterminant génétique est localisé dans la région responsable de l'immunité, entre les gènes cI et cII (en collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris et l'Institut du Cancer de Toronto).
- L'immunité des bactéries lysogènes bloque la réplication virale autonome *directement* (et pas seulement en empêchant la production d'une substance diffusible nécessaire à la réplication) (en collaboration avec le laboratoire de microbiologie du Karolinska Institutet à Stockholm).
- Il est possible de court-circuiter, par surinfection hétéroimmune, le blocage exercé par l'immunité sur l'expression d'une partie des gènes du prophage. Les résultats montrent que la plupart des fonctions d'un bactériophage tempéré sont induites par le produit diffusible d'une fonction plus précoce. L'immunité bloque la plupart des fonctions de manière indirecte, en empêchant l'expression du gène qui produit l'inducteur primaire.

### 2.2 — Spécificité de la traduction

On peut mettre en évidence une différence dans la constitution de la subunité 30S des ribosomes, entre deux souches bactériennes qui ne diffèrent que par une mutation, affectant la spécificité de la traduction (la souche 112-12, qui lit le triplet UAG : fin de chaîne, et son dérivé, 112-121, qui lit le même triplet : glutamine).

## 3 — RAPPORT SCIENTIFIQUE

Les activités du laboratoire de Génétique peuvent être groupées en deux sujets fondamentaux :

- *Les mécanismes de régulation* et, plus particulièrement, le *contrôle de la réplication* et le *contrôle de l'expression* génétiques.
- *La spécificité de la traduction* des chaînes polynucléotidiques en chaînes polypeptidiques et, plus particulièrement, le *rôle des ribosomes* dans cette spécificité.

### 3.1 — Le contrôle de la réplication et de l'expression génétiques chez les bactériophages tempérés

#### 3.1.1 — Introduction

Pour l'étude des *mécanismes de contrôle*, nous nous sommes adressés à un groupe de bactériophages tempérés, dits « lambdoïdes » et à leur hôte, la bactérie *Escherichia coli*. Ce système se prête particulièrement à l'analyse des mécanismes de contrôle car une même structure génétique — le « chromosome » du bactériophage — peut, selon les conditions :

- se multiplier de manière autonome dans le cytoplasme bactérien (et diriger la synthèse d'un ensemble de protéines dont certaines s'assemblent autour du chromosome pour former des particules de phage mûr);
- être intégré (sous le nom de *prophage*) dans le chromosome bactérien, dont il adopte le rythme de multiplication (et dans ce cas, aucune des fonctions proprement virales n'est exprimée) : on dit alors que la bactérie est *lysogène* pour le phage considéré;
- rester inerte dans le cytoplasme bactérien. C'est le cas lorsqu'un bactériophage tempéré infecte une bactérie lysogène pour un phage homologue : on dit que la bactérie est immune vis-à-vis du bactériophage considéré.

On se trouve donc en présence d'un système où se pose de manière spécialement schématique — et, nous le verrons, accessible à une analyse poussée — le problème de la régulation du développement.

Nous exposerons brièvement ici quelques notions indispensables à la compréhension du travail :

1. On sait que la capacité de lysogéniser dépend d'un groupe de loci génétiques (cI, cII, cIII) localisés en un petit segment du chromosome du phage. La plupart des mutations qui atteignent ces loci suppriment (cI) ou réduisent très sensiblement (cII, cIII) la capacité de lysogéniser et se traduisent par la formation de plages de lyse « claires » (c'est-à-dire, sans croissance bactérienne, faute de lysogénisation), d'où le nom de mutations « claires » (c).
2. L'immunité est une propriété hautement spécifique, en ce sens qu'une bactérie lysogène pour un phage donné est immune vis-à-vis de ce phage et de la plupart de ses mutants, mais elle ne l'est généralement pas vis-à-vis de bactériophages d'origine différente (même si les deux phages sont suffisamment voisins pour donner des réactions sérologiques croisées et pour se recombiner entre eux). On dit que deux plages de spécificité d'immunité différente sont *hétéroimmuns* et que deux plages de même spécificité d'immunité sont *homoimmuns*.
3. La spécificité de l'immunité est déterminée par une région génétique étroitement centrée autour du segment cI : ainsi, à la suite d'un croisement entre les phages  $\lambda$  et 434, les descendants ont l'immunité caractéristique de  $\lambda$  ou celle de 434, selon qu'ils ont hérité leur région cI du parent  $\lambda$  ou du parent 434.
4. L'immunité comporte deux aspects distincts, dont l'interaction est complexe :
  - a) le blocage de la synthèse des protéines caractéristiques du phage;
  - b) le blocage de la réplication autonome du chromosome viral.
  - a) Le premier aspect s'explique en grande partie par la théorie générale de la régulation des synthèses protéiques (Jacob et Monod, 1961) : le prophage synthétise un *répresseur* cytoplasmique, dont le site d'action, situé sur le chromosome du phage, est désigné sous le nom d'« *opérateur* ». Les molécules de répresseur agissent sur l'opérateur du prophage et sur d'éventuels génomes de phages surinfectants, bloquant ainsi l'ensemble des fonctions virales. A chaque spécificité d'immunité doit correspondre une paire d'éléments génétiques qui se correspondent : un *gène de régulation*, responsable de la formation du répresseur, et un opérateur. Il semble bien que ces deux éléments soient localisés sur le segment cI.
  - b) Comme nous le verrons, la réplication du chromosome viral nécessite la synthèse préalable d'enzymes dits « précoces ». Il suffit d'admettre que le répresseur bloque la synthèse des enzymes précoces pour expliquer que la réplication virale soit (indirectement) bloquée par l'immunité (Jacob et Monod, 1961) (« hypothèse du contrôle indirect de la réplication »). Cette vue a été reprise sous une forme plus spécifique par Jacob et Brenner (1963) dans la « théorie du réplicon », qui admet l'existence, pour chaque type d'unité de réplication (réplicon), d'un enzyme précoce *spécifique*, l'*initiateur*; c'est en bloquant la synthèse de l'initiateur que l'immunité agirait sur la réplication des bactériophages tempérés.



### 3.1.2 — Exposé des recherches entreprises

#### 3.1.2.1 — Mise en évidence des fonctions « précoces » nécessaires à la répllication des bactériophages tempérés.

a) *par l'étude des effets du blocage des synthèses protéiques sur le processus de répllication*  
(R. Thomas, L. Pereira da Silva, J. Lecointe)

Nous avons mis en évidence antérieurement (Thomas, 1959) le fait qu'une synthèse protéique est nécessaire au déclenchement de la répllication, après infection d'une souche bactérienne sensible par le bactériophage tempéré  $\lambda$  : le chloramphénicol (qui bloque les synthèses protéiques) empêche la répllication s'il est ajouté au moment de l'infection, mais non s'il est ajouté quelques minutes après. L'interprétation, ultérieurement confirmée, de ce résultat était la suivante : comme les bactériophages virulents du type « T pairs », les bactériophages tempérés doivent synthétiser des enzymes « précoces » avant de pouvoir se répliquer.

Ce travail a été étendu en directions diverses :

$\alpha$ ) Substitution du système : bactéries lysogènes induites au système : bactéries sensibles infectées.

Cette extension de nos recherches précédentes était souhaitable pour des raisons techniques aussi bien que par souci de généralisation. Les premières données dans ce sens, obtenues peu avant l'entrée en vigueur du contrat, ont fait l'objet d'une note préliminaire (Delhay et Thomas, 1961). Ces données ont été confirmées et fortement étendues. Dans leur état actuel, les résultats peuvent se résumer comme suit :

On sait qu'après induction ultra-violette d'une culture de bactéries lysogènes, le matériel génétique viral ne se multiplie qu'après une latence de l'ordre de 20 minutes. Des concentrations de chloramphénicol (CP) suffisantes pour empêcher presque totalement cette multiplication végétative lorsqu'elles sont ajoutées au moment de l'induction, permettent au contraire une multiplication végétative abondante (d'un facteur 10 et plus) lorsqu'elles sont appliquées sensiblement plus tard (par exemple 20-25 minutes après l'induction). Ces résultats confirment l'existence d'une phase initiale de l'infection, sensible aux inhibiteurs des synthèses protéiques. Ils montrent, en outre, que la multiplication du matériel génétique viral *en présence* de CP n'est pas limitée à un doublement, comme nos résultats précédents auraient pu le faire craindre.

La technique de mesure de la multiplication du matériel génétique viral comporte la surinfection des bactéries par un second type de phage. Les « chromosomes » du phage surinfectant, ajoutés *après* l'addition de chloramphénicol, se multiplient en présence de l'antibiotique. L'étape initiale déclenchée par l'induction du phage primaire est donc « valable » pour la multiplication des chromosomes de type surinfectant. Il faut en conclure que *l'étape initiale sensible aux inhibiteurs des synthèses protéiques ne comporte pas le transfert obligé de l'ensemble de l'information de l'acide désoxyribonucléique (ADN) à une structure non désoxyribonucléique.*

$\beta$ ) Nous avons testé le degré de non-spécificité de l'étape initiale, en utilisant des phages primaire et surinfectant différant par un nombre croissant de marqueurs génétiques. Les paires de phages suivantes ont été utilisées :

$\lambda_{c^+h^+}$  —  $\lambda_{ch}$   
 $\lambda_{c^+}$  — 434hy C<sub>119</sub>  
434 — 434hy C<sub>119</sub>

Dans tous les cas, l'étape initiale déclenchée par le phage primaire s'est révélée valable pour la multiplication du génome secondaire. Il est important de remarquer que les phages de la deuxième paire ne diffèrent que par deux marqueurs, mais que l'un de ces marqueurs est responsable de la spécificité de l'immunité. *Il faut donc conclure de ce résultat que l'étape initiale est aspécifique au point de ne pas « distinguer » deux phages lambdaïdes dont la spécificité d'immunité est différente.* Enfin, les phages de la troisième paire, quoique « de même nom » (434) sont profondément différents l'un de l'autre car ils n'ont en commun que la région responsable de l'immunité (434) qui résulte de croisements répétés entre  $\lambda$  et 434 et n'a gardé de 434 que sa région cI). *Ainsi l'étape initiale ne différencie aucun des nombreux marqueurs génétiques qui distinguent les deux phages tempérés,  $\lambda$  et 434.*

Remarquons que, comme on pouvait s'y attendre, un phage surinfectant différant du phage primaire par la spécificité de son immunité, se multiplie sans attendre la levée de l'immunité, consécutive à l'induction ultra-violette.

$\gamma$ ) (Dr. L.H. Pereira da Silva) — Etude de la multiplication végétative dans des conditions d'inhibition temporaire des synthèses de protéines et d'acide ribonucléique.

L'inhibition de la synthèse nette de protéines et de RNA est obtenue par passage brusque d'un milieu riche (tryptone) en un milieu minimum (« shift down » : Kjeldgaard *et al.* 1958). M. Silva a étudié successivement les effets du « shift down » :

- sur la croissance (masse bactérienne déterminée par mesure de la densité optique) des bactéries non infectées;
- sur la formation du phage mûr;
- sur la multiplication du matériel génétique (expériences de surinfection de bactéries sensibles infectées).

L'effet du « shift down » sur la croissance bactérienne est extrêmement net : une latence de 4 heures est suivie d'une reprise progressive de la croissance au taux caractéristique du nouveau milieu. La formation de phage mûr est affectée de la même manière que la croissance bactérienne. La multiplication des marqueurs génétiques est bloquée de manière prolongée si le « shift down » a lieu aussitôt après l'infection. Ces résultats sont superposables à ceux qui ont été obtenus en bloquant les synthèses protéiques par le chloramphénicol.

Ces résultats ont été complétés par la vérification radiochimique des effets du « shift down » sur la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines (par incorporation d'uracile- $^{14}\text{C}$  et de phénylalanine- $^{14}\text{C}$  (Pereira da Silva et Thomas, 1963, a et b).

$\delta$ ) (M<sup>me</sup> J. Lecointe) — Effet sélectif de la température sur certaines étapes de la croissance du bactériophage.

M<sup>me</sup> J. Lecointe a étudié les effets de la température sur la croissance du bactériophage  $\lambda$  après induction d'une souche bactérienne lysogène. Il a été constaté au cours de cette étude que l'une des étapes précoces du développement est considérablement hâtée par des températures élevées qui bloquent totalement la formation de phage mûr.

Nous nous sommes attachés à préciser la nature de l'étape thermophile par l'étude des effets de la température sur la réplication génétique (expériences de surinfection) : à 43° la latence qui précède la multiplication végétative est sensiblement raccourcie (10 min, au lieu de 20 min à 37°), sans que la vitesse de la réplication soit sensiblement modifiée. Corrélativement, la période initiale sensible au chloramphénicol est raccourcie. Cette partie du travail a fait l'objet d'une courte publication (Lecointe-Hardt et Thomas, 1962).

Que l'étape thermophile soit la levée de l'immunité de la bactérie lysogène paraît résulter de ce que l'effet, extrêmement net dans le cas des bactéries lysogènes induites, ne se manifeste pas dans le cas de bactéries sensibles infectées. Ceci peut sans doute être mis en relation avec le fait, bien connu, que le taux de lysogénéisation tend à décroître lorsque la température s'élève; cependant, contrairement à d'autres souches lysogènes tout récemment découvertes, la souche utilisée dans ces expériences n'est nullement induite par la seule élévation de la température.

### 3.1.2.2 — par l'isolement et la caractérisation de mutants défectifs.

#### *α) Mutants «sus» (sensibles au supprimeur).*

(Debast, Douat, Dambly, Neerdaels, Maurer).

Au moins deux triplets (triplets «nonsense»: UAG = «amber»; UAA = «ochre») de nucléotides sont interprétés comme des signaux de terminaison de chaîne polypeptidique par le système de décodage de l'information génétique. Lorsqu'une mutation a pour résultat l'apparition d'un tel triplet, la chaîne polypeptidique codée par le gène muté est interrompue. Il existe des mutations bactériennes («supprimeurs d'amber», «supprimeurs d'ochre»,  $su^+$ ) qui altèrent la spécificité de la lecture de telle sorte que ces triplets «signifient» un acide aminé, et que, par conséquent, la lecture se poursuit. On connaît de nombreuses mutations «nonsense» chez les bactériophages; elles peuvent, en principe, affecter n'importe quel gène et, par conséquent, servir à identifier les gènes de l'organisme. Si une telle mutation affecte un gène nécessaire au développement du phage, le phage se comportera comme défectif sur la plupart des souches (souches «non permissives»,  $su^-$ ), mais comme un phage normal sur les souches permissives,  $su^+$ .

Les mutants amber de  $\lambda$  sont appelés «sus» (sensibles au supprimeur) (Campbell, 1961). Campbell a isolé une centaine de mutants sus, qu'il a pu répartir en 18 cistrons (carte génétique, voir p. 100). Parmi ces 18 cistrons (A-R), trois (N, O, P) sont des cistrons «précoces» dont la fonction est nécessaire à la réplication (Brooks, 1965). Nous avons isolé un certain nombre de mutants sus supplémentaires pour voir s'il était possible d'identifier de la sorte de nouveaux cistrons, et, en particulier, de nouveaux cistrons précoces. 21 mutants sus nouveaux ont été isolés, les uns par la technique de Campbell, les autres par une technique nouvelle, qui donne un spectre de mutants très différent (majorité de mutants N et R). Tous les mutants isolés affectent des *cistrons* déjà identifiés par Campbell, et certains même affectent des *sites* déjà identifiés. Il semble donc que l'isolement de nouveaux mutants sus ne doive plus guère permettre d'identifier de nouveaux cistrons. En outre, le nombre moyen de sites par gène, susceptibles de donner lieu à une mutation sus, est petit (habituellement 2-3) et il paraît dès lors raisonnable de penser que certains gènes n'en possèdent aucun. C'est pourquoi nous avons poursuivi ce travail par l'étude d'autres types de mutants défectifs (voir  $\beta$ ).

Les mutants sus isolés au laboratoire nous ont, par ailleurs, rendu d'incalculables services, en particulier en tant que marqueurs génétiques et pour l'identification des supprimeurs bactériens. Nous avons en outre isolé un mutant ochre de  $\lambda$  (P. Neerdaels) et une série de mutants amber du phage lambdaoïde Ø 80 (Maurer) dans le but d'amorcer l'étude génétique de ce bactériophage. Les agents mutagènes utilisés étaient : les radiations ultra-violettes et X, les analogues de bases et l'hydroxylamine.

#### *β) Mutants défectifs absolus.*

(R. Thomas et L. Lambert, en collaboration avec les Laboratoires du Dr. Jacob à Paris, du Dr. Siminovitch à Toronto et du Dr. Ageno à Rome).

L'isolement de nouveaux mutants «sus» ne permettant plus l'identification de nouveaux cistrons précoces, nous nous sommes tournés vers les mutants défectifs absolus, et avons entrepris

la localisation et l'analyse fonctionnelle de mutants isolés à Paris (p22, p30) et à Toronto (t5, t11, t27 etc.). Au cours de ce travail, nous avons élaboré un mode d'analyse des données de recombinaison génétique (Thomas, Frontali, Reale, Pereira da Silva et Jacob, en préparation). Cette étude (Eisen, Fuerst, Siminovitch, Thomas, Lambert, Pereira da Silva et Jacob, *Virology*, sous presse; Thomas, en préparation) a permis de classer une partie des mutants défectifs absolus dans des cistrons déjà connus (N, O, P, Q, R). En outre, un groupe de 5 mutants définit une nouvelle classe ("x) de mutants précoces, dont la lésion se localise dans la région responsable de la spécificité de l'immunité, entre les gènes cI et cII. La région nouvellement identifiée revêt un intérêt particulier, sur lequel nous reviendrons plus loin (2, b).

### 3.1.2.2 — Analyse génétique de la région responsable de la spécificité de l'immunité.

a) (R. Thomas) Etude des rapports structuraux entre le gène de régulation et l'opérateur responsables de l'immunité.

La région cI, responsable de la spécificité de l'immunité, doit comporter un «récepteur» et un «émetteur» spécifiques (l'«opérateur» et le gène de régulation de la théorie de Monod). En effet, dire qu'un phage x a l'immunité caractéristique de  $\lambda$ , par exemple, signifie :

- que ce phage x est incapable de pousser dans une bactérie lysogène pour  $\lambda$  (c'est-à-dire est sensible au répresseur formé par le prophage  $\lambda$ , ou encore, possède l'opérateur  $o_\lambda$  caractéristique de  $\lambda$ );
- que ce phage x, devenu prophage d'une bactérie lysogène, empêche les phages  $\lambda$  de croître dans cette bactérie lysogène (c'est-à-dire, forme un répresseur auquel  $\lambda$  est sensible, ou encore, possède le gène de régulation  $r_\lambda$  caractéristique de  $\lambda$ ).

Nous avons cherché à déterminer jusqu'à quel point ces deux structures sont étroitement unies (rappelons que dans les systèmes bactériens connus le gène de régulation n'est pas nécessairement proche de l'opéron qu'il contrôle). La technique utilisée tire parti :

- de ce que d'éventuels recombinants entre opérateur et gène de régulation, de phages de spécificité d'immunité différente, se manifesteraient comme des mutants cI du phage dont ils ont l'opérateur;
- de ce qu'il est possible d'éliminer la grande majorité des mutants clairs sans affecter grandement le nombre des éventuels recombinants cherchés, par l'emploi de marqueurs sélectifs encadrant étroitement la région immunité;
- de ce qu'un phage, même incapable de lysogéniser par lui-même, peut former une bactérie doublement lysogène après infection mixte avec un autre phage de même opérateur. Il est donc possible de tester la spécificité du répresseur, même d'un phage incapable de lysogéniser par lui-même.

Ce travail (Thomas 1964, *J. Mol. Biol.*, **8**, 247-253) a permis de montrer l'étroite liaison entre les deux éléments génétiques responsables de l'immunité : l'opérateur, qui n'a pu être jusqu'ici identifié sans ambiguïté par des mutations caractéristiques, a néanmoins pu être localisé à proximité immédiate de gène de régulation, et au moins en partie à l'intérieur de la zone de non-homologie entre  $\lambda$  et 434.

b) (P. Brachet et B. Green) Le gène « x ».

Nous avons signalé plus haut (3.1.2.2 $\beta$ ) la mise en évidence de ce gène. Il est remarquable de constater l'absence totale de mutants sus ou sensibles à la température du gène x. En outre, on ne trouve pas de sus ni de sensible à la température parmi les révertants des mutations x (P. Brachet). Ceci suggère que ce gène ne synthétise pas de protéine; il pourrait dès lors s'agir du gène opérateur, ou du réplicateur (point de départ de la réplication). Nous avons vu que l'opérateur doit précisément se trouver dans cette région. Nous verrons par ailleurs (3.1.2.3) qu'il y a certaines raisons d'y localiser aussi le réplicateur. Si les mutations x affectaient le réplicateur, l'incapacité de réplication des mutants x ne pourrait être restaurée par complémentation (contrairement à celle des mutants N, O et P). Cette possibilité est l'objet d'une étude très active.

c) (S. Mousset) Hétérozygotes d'immunité.

S. Mousset a mis en évidence, lors de la surinfection d'une souche lysogène par un phage hétéroimmun, la formation de particules, partiellement diploïdes, hétérozygotes pour une région étendue qui comprend l'immunité (manuscrit envoyé aux Annales de Génétique).

d) (J. Roscam, E. Maurer) Etude de l'homologie des phages  $\lambda$  et  $\phi 80$ .

Nous avons entrepris l'étude de l'homologie entre deux phages lambdaïdes, dans le but de voir si l'ordre des gènes répond à une nécessité fonctionnelle, et quelles peuvent être les relations entre l'homologie génétique (mesurée par les fréquences de recombinaison) et l'homologie fonctionnelle, en particulier dans la région responsable de l'immunité. Jusqu'ici le travail a consisté à isoler et à caractériser des mutants « amber », et à étudier la spécificité d'attachement au chromosome bactérien d'hybrides entre  $\lambda$  et 80.

### 3.1.2.3 — Etude du contrôle de la réplication génétique.

(R. Thomas, en collaboration avec E. Bertani, Karolinska Institutet, Stockholm).

Les bactéries lysogènes sont immunes vis-à-vis de la surinfection par le bactériophage qu'elles perpétuent à l'état de prophage. Cependant, elles sont lysées et produisent du phage de type surinfectant, si elles sont surinfectées par d'autres bactériophages, même très voisins, ou même, par certains mutants (dits « virulents ») du bactériophage qu'elles perpétuent. Nous avons cherché à savoir ce qu'il advient, dans ces conditions, du prophage. Nous avons observé que le prophage n'est pas induit. Les rares particules qui ont hérité des marqueurs génétiques du prophage sont presque toutes recombinées avec des marqueurs surinfectants (Thomas, 1962) et beaucoup d'entre elles sont partiellement diploïdes, hétérozygotes pour une région qui inclut l'immunité.

Nous avons alors réalisé des surinfections *mixtes* de souches lysogènes par un phage de même spécificité d'immunité que le prophage (et, donc, sensible à l'immunité de la bactérie lysogène) et par un mutant « virulent », c'est-à-dire, insensible à l'immunité. L'hypothèse du contrôle indirect de la réplication fait prévoir que, dans ces conditions, l'expression des fonctions précoces par les chromosomes surinfectants virulents permette la réplication, non seulement de ces derniers, mais aussi des chromosomes surinfectants non virulents, dont les fonctions sont bloquées par l'immunité. Ce type d'expériences a été réalisé en utilisant une série de combinaisons différentes de marqueurs génétiques pour le prophage et les deux types surinfectants. Dans tous les cas, et contrairement aux prévisions de l'hypothèse du contrôle indirect de la réplication, on a observé une réplication normale du phage virulent, mais *pas de réplication du phage non virulent*, et ceci a été confirmé par une série d'expériences de rendements individuels. Les contrôles (infection mixte d'une bactérie non lysogène, surinfection mixte d'une bactérie lysogène induite), montrent que ce résultat n'est pas dû à un banal avantage sélectif du phage virulent sur le non virulent.

Des données entièrement semblables ont été obtenues indépendamment par E.L. Bertani (Karolinska Institutet, Stockholm) et les deux ensembles de résultats ont été groupés en une publication commune (Thomas et Bertani, 1964, *Virology*, **24**, 241-253).

Nous avons pu, depuis, vérifier l'absence de réplication du phage surinfectant non virulent, d'une manière sensiblement plus rigoureuse, basée sur le marquage des fibres de DNA parentales par une « modification induite par l'hôte » (Thomas, 1965, *Arch. Biol.*, **76**, 551-563).

Ainsi, un chromosome de phage  $\lambda$  non virulent, qui surinfecte une bactérie lysogène pour  $\lambda$ , reste bloqué dans sa réplication même si toutes les fonctions nécessaires à la réplication d'un chromosome de  $\lambda$  sont exprimées, dans la même cellule, par un chromosome de  $\lambda$  virulent. Sauf complications, qui seront détaillées ci-dessous, ces résultats indiquent que le blocage de la réplication ne repose pas entièrement sur la répression de la synthèse de substances diffusibles nécessaires à la réplication : *le répresseur responsable de l'immunité bloque directement la réplication des phages homologues surinfectants, comme elle bloque la transcription de l'information.*

En termes plus chimiques, le répresseur de l'immunité bloque l'action de la DNA polymérase, comme celle de la RNA polymérase; l'interprétation la plus simple serait que, chez ces organismes, les sites de départ des deux enzymes sur le chromosome sont confondus.

Examinons maintenant les complications qui pourraient altérer ce raisonnement :

- a) on peut imaginer que, parmi les mutations qui différencient le phage surinfectant virulent du phage surinfectant non virulent, l'une affecte la spécificité d'une fonction précoce, de telle sorte que le produit de cette fonction ne puisse plus initier la réplication du phage non virulent. Pour éliminer cette objection, nous avons utilisé, comme phage virulent, le mutant  $\lambda_{17c90}$  de Pereira da Silva et Jacob et, comme phages surinfectants non virulents, des phages portant soit l'une ( $c_{17}$ ), soit l'autre ( $c_{90}$ ) des deux mutations qui, prises ensemble, confèrent la virulence. Les résultats étant les mêmes dans les deux cas, on peut en conclure que ni l'une ni l'autre des deux mutations n'affecte la spécificité d'un enzyme initial.
- b) Le fait que le phage surinfectant virulent n'« aide » pas le chromosome non virulent à se répliquer pourrait aussi s'expliquer si l'une des fonctions précoces ne pouvait agir qu'en configuration « cis », en d'autres termes, ne consistait pas en la synthèse d'une substance librement diffusible. On ne peut exclure avec certitude cette possibilité qu'après avoir vérifié que *toutes* les fonctions initiales sont complémentables. Le test lui-même est simple, mais la démonstration requiert l'identification de toutes les fonctions précoces.

#### 3.1.2.4 — Etude du contrôle du développement (contrôle de l'expression des fonctions).

- a) (R. Thomas) La « complémentation par le prophage ».

Il est peu probable, pour diverses raisons, que l'ensemble du chromosome d'un bactériophage tempéré constitue une seule unité d'expression; plus vraisemblablement, il doit y avoir plusieurs unités d'expression dont une seule est directement contrôlée par l'immunité. Comment l'immunité exerce-t-elle son contrôle sur les autres unités d'expression? Il faut supposer que l'expression de ces fonctions dépend de la réalisation préalable d'un événement qui est lui-même contrôlé par l'immunité. On peut concevoir, *a priori*, cet événement comme *devant* se produire en *cis* (réplication du chromosome, circularisation, etc.) ou, au contraire, comme *pouvant* se produire en *trans*: formation d'une substance diffusible nécessaire au déclenchement de la fonction. Si l'expression de certaines fonctions est, effectivement, contrôlée de cette dernière façon, on peut s'attendre à ce que le contrôle, indirect, exercé sur ces fonctions par l'immunité, puisse être court-circuité, en fournissant, d'une manière ou d'une autre, la ou les substances diffusibles considérées. Nous avons pu montrer que tel est bien le cas.

Admettons que l'expression d'une fonction x dépende de la production préalable d'une substance diffusible, produit direct ou indirect d'un gène A, lui-même contrôlé par l'immunité :

chromosome de phage  $\longrightarrow$  expression de A  $\longrightarrow$  expression de x

Dans une bactérie lysogène, la fonction A ne sera pas exprimée à cause de l'immunité, et la fonction x ne sera pas exprimée, faute d'expression préalable de A:

prophage  $\begin{array}{c} \uparrow \\ \text{---} \\ \downarrow \\ \text{immunité} \end{array}$

Dans une bactérie sensible, infectée par un mutant déficient x, on aura la situation suivante:

chromosome de phage  $\longrightarrow$  expression de A  $\begin{array}{c} \uparrow \\ \text{---} \\ \downarrow \\ \text{mutation } x^- \end{array}$   
défectif

Considérons maintenant le cas d'une bactérie lysogène surinfectée par un phage déficient  $x^-$  de spécificité d'immunité différente. Pour autant que les substances diffusibles nécessaires au déclenchement de la fonction x soient interchangeables entre les deux types de phage, on peut s'attendre à la situation suivante:

immunité  $\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{---} \\ \uparrow \end{array}$   
prophage 434  $\longrightarrow$  A  $\begin{array}{c} \uparrow \\ \text{---} \\ \downarrow \\ \text{mutation } x^- \end{array}$  Expression de x par le prophage  
phage surinfectant  $\longrightarrow$  A  $\begin{array}{c} \uparrow \\ \text{---} \\ \downarrow \\ \text{mutation } x^- \end{array}$  Formation et libération de particules  $\lambda x^-$   
défectif ( $\lambda x^-$ )

En pratique, nous avons testé ces prévisions en utilisant des souches non-permissives lysogènes (ou non : contrôles) et en les surinfectant par différents mutants sus. Le résultat est positif pour plusieurs mutants sus du bras droit de  $\lambda$  : alors que ces mutants ne produisent pas de descendance par infection d'une souche non-permissive, ils produisent un rendement normal après infection de la même souche, mais lysogène pour le phage 434 hybride (« complémentation par le prophage »). Le résultat est particulièrement net pour les mutants sus du cistron R (gène de structure du lysozyme) et P. Un ensemble de contrôles très satisfaisants montre que c'est bien le prophage lui-même qui, à la suite de la surinfection, exprime la fonction manquante au phage surinfectant déficient. Il paraît donc clair que l'expression d'une partie des gènes du prophage peut être induite par surinfection à l'aide d'un phage hétéroimmun. *Il faut en conclure que ces fonctions ne sont contrôlées qu'indirectement par l'immunité, et que, dans les conditions « normales » (en absence d'immunité) leur expression est déclenchée par une substance diffusible, produit direct ou indirect d'un gène plus précoce.*

Le système que nous utilisons se prête à une extension considérable de ce genre d'études. L'un des développements les plus intéressants est, sans aucun doute, le fait que même certains mutants déficients absolus (Appleyard, 1954) peuvent être mis en évidence sous forme de plages de lyse; il suffit pour cela de les étaler sur une souche lysogène pour un phage hétéroimmun approprié. Dans certains cas (mutants absolus du gène R, par exemple) la valeur élevée des titres obtenus montre que l'efficacité d'étalement (eop) doit être voisine de l'unité; en d'autres termes,

pratiquement chaque particule défective donne lieu à la formation d'une plage de lyse. Cette observation — qui est une conséquence logique du phénomène de « complémentation par le prophage » — ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude des mutants défectifs absolus.

L'ensemble de résultats concernant la surinfection de souches non permissives lysogènes par des mutants sus (doublé de l'analyse des *eop* de mutants sus et défectifs absolus sur les souches lysogènes) suggère que la plupart des gènes du prophage sont contrôlés indirectement par l'immunité : ces gènes sont normalement induits par le produit diffusible d'un gène plus précoce. Le gène N fait clairement exception : il n'est pas induit par surinfection et est, selon toute probabilité, sous le contrôle direct de l'immunité. Par contre, l'un des gènes dont l'inductibilité par surinfection est la plus manifeste, P, est un gène précoce, nécessaire à la réplication : ce gène précoce est donc normalement induit par un produit diffusible d'un gène plus précoce encore, probablement N.

b) (O. Dambly, M. Couturier et R. Thomas) Etude du contrôle de la production de lysozyme.

Les méthodes utilisées dans le travail précédent donnent, en principe, des renseignements sur le mode de régulation de n'importe quel gène; cependant l'expression des gènes n'y est estimée qu'au niveau de la production de phage mûr. Aussi tenions-nous à étudier l'expression, ne fût-ce que d'un gène, directement au niveau de l'activité de l'enzyme codé par ce gène; le lysozyme était tout indiqué pour une telle étude.

Ces données confirment et complètent utilement celles de la section précédente. En particulier, nous avons pu démontrer de manière directe l'induction, par surinfection hétéroimmune, de la synthèse de lysozyme par le prophage d'une bactérie lysogène.

Nous attachons une importance particulière aux résultats obtenus dans le cas de la souche bactérienne U374 de Calif. Cette souche porte un  $\lambda$  « cryptique », amputé d'une région qui couvre notamment l'entièreté du segment responsable de l'immunité. Il est remarquable que le prophage, pourtant dépourvu du gène *cI* qui forme le répresseur de l'immunité, ne synthétise pas de lysozyme; la synthèse de lysozyme est induite par surinfection avec des mutants, même défectifs, de  $\lambda$  — mais pas par les mutants du gène N. Ces résultats montrent qu'un gène comme le gène R (gène de structure du lysozyme) ne fonctionne pas à l'état de prophage, faute de l'inducteur approprié. Dans une bactérie lysogène normale, la formation de cet inducteur est bloquée par l'immunité. Dans la souche cryptique, elle n'a pas lieu parce que le gène inducteur manque — mais l'inducteur peut être suppléé par surinfection à l'aide d'un mutant autre qu'un mutant N.

Nous sommes arrivés au modèle suivant pour rendre compte du contrôle du développement du bactériophage  $\lambda$  :

- le gène N est le gène de structure d'une protéine qui est (ou catalyse la formation de) l'inducteur précoce. Ceci expliquerait pourquoi les mutants du gène N n'expriment aucune fonction lytique.
- O et P, les gènes de structure des enzymes de réplication sont induits par le gène N. Les mutants de O et P n'expriment pas pleinement certaines fonctions autre que la réplication (la lyse cellulaire, par exemple) probablement par suite d'un simple effet de dosage de gène.
- Il devrait y avoir au moins un autre gène (Q, comme l'a suggéré Dove?), directement ou indirectement induit par N, et opérant comme un inducteur des fonctions tardives.
- Le répresseur de l'immunité, codé par le gène *cI*, ne bloque directement qu'une partie du chromosome viral (y compris le gène N), et donc indirectement les autres fonctions. En outre (Thomas et Bertani, 1964), l'interaction du répresseur avec le chromosome de phage doit aussi exercer un blocage direct de la réplication.

Ces résultats expérimentaux et les déductions qui en ont été tirées peuvent servir de modèle pour les mécanismes généraux qui assurent l'expression ordonnée des gènes dans un processus de développement. En accord avec des résultats obtenus dans un autre système (Englesbert et al., 1965), ils suggèrent fortement l'existence d'une régulation *positive* de la synthèse des protéines, en plus de la régulation négative, aujourd'hui classique, découverte par Jacob et Monod (1961).

### 3.2 — Le rôle des ribosomes dans la spécificité de la traduction des chaînes polynucléotidiques en chaînes polypeptidiques

On considère généralement que les ribosomes interviennent dans la formation des chaînes polypeptidiques comme des éléments nécessaires à l'assemblage des acides aminés, mais dépourvus d'influence sur la *spécificité* de la traduction du RNA messager en polypeptides : cette spécificité reposerait entièrement sur l'assortiment de RNA de transfert et d'enzymes d'activation des acides aminés.

Nous sommes arrivés à des conclusions différentes à la suite de recherches qui vont être esquissées ci-après. Ajoutons que divers auteurs et, en particulier, Gorini et ses collaborateurs sont arrivés, indépendamment, à l'idée que les ribosomes participent à la spécificité du décodage.

#### 3.2.1 — Le caractère pléiotrope des mutations conférant la résistance à la streptomycine (M. Couturier, L. Lambert et R. Thomas)

Il paraît clair depuis peu que, conformément à l'hypothèse de Spotts et Stanier (1961), le gène bactérien responsable de la réaction vis-à-vis de la streptomycine intervient dans la détermination de la structure des ribosomes : les différents allèles de ce gène conditionnent la formation de subunités ribosomiales «30S» différentes, ce qui se traduit par la sensibilité,  $Sm^s$ , la résistance,  $Sm^r$  ou la dépendance,  $Sm^d$  de l'organisme vis-à-vis de la streptomycine.

Nous avons étudié les propriétés de nombreux mutants  $Sm^r$  de souches d'*Escherichia coli* K12 et, particulièrement, de la souche C600 (Appleyard 1954). La plupart des mutations  $Sm^r$  de la souche C600 fonctionnent comme des supprimeurs à effets multiples. Les effets suivants ont été mis en évidence :

- suppression des effets d'une mutation affectant la structure ou la synthèse du répresseur caractéristique du phage  $\lambda$  (mutation thermosensible  $\lambda_{C72}$ );
- altération du taux de croissance de la bactérie;
- suppression du phénomène de restriction de la croissance des phages  $\lambda$ , 434 et 82 dans les bactéries lysogènes pour P1;
- suppression partielle des effets du supprimeur bactérien  $suII^+$  présent dans la souche C600 : l'efficacité d'étalement de *certain*s mutants  $su$  (voir 3.1.2.2.a) est réduite d'un facteur  $10^5$ . Un effet analogue, quoique moins marqué, a été observé, avec nos mutants  $Sm^r$ , sur l'efficacité d'étalement des mutants amber du phage T4 (Epstein, communication personnelle);
- suppression de l'expression de la virulence du phage  $\lambda_{C17C90}$ .

Il est important de noter que le caractère ribosomal de la mutation  $Sm^r$  a été vérifié de manière directe pour celle des mutations de C600 que nous avons le plus étudiée (voir la section suivante).

### 3.2.2 — *Etude comparative des propriétés des ribosomes provenant de souches Sm<sup>s</sup> (sensibles à la streptomycine) et Sm<sup>r</sup>* (A. Herzog)

Herzog a pu montrer que l'addition de Sm à une culture d'*Escherichia Coli* sensibles (C600) conduit, en quelques minutes, à une altération des ribosomes 70S, qui ne se dissocient plus en leurs constituants 50S et 30S par abaissement de la concentration en Mg à  $10^{-8}$ M. Ce phénomène n'a pas lieu chez les souches Sm<sup>r</sup>. Chez les souches Sm<sup>s</sup>, il est, comme l'effet létal de la Sm, inhibé par l'addition de chloramphénicol.

Ces résultats confirment l'idée que la Sm agit au niveau des ribosomes et que la résistance à la Sm est liée à une modification de la structure de ces particules.

Au cours de ce travail, A. Herzog a mis au point (en collaboration avec R. Lombaert et R. Hamers) un dispositif qui permet l'enregistrement automatique des résultats d'ultracentrifugations en gradient de densité; on peut ainsi détecter les différents pics de ribosomes (70S, 50S, 30S) et les pics de polysomes sur des quantités de l'ordre de quelques microgrammes (Herzog, Lombaert et Hamers, 1966).

### 3.2.3 — *Etude du mode d'action des mutations «suppresseurs d'amber»* (A. Bollen et A. Herzog)

Nous avons décrit plus haut (3.1.2.2.α) les mutations du type «amber» et leurs supresseurs. Rappelons que ces dernières mutations altèrent la spécificité du code génétique de telle sorte que le triplet UAG, au lieu d'être interprété comme un signal de fin de chaîne, soit lu comme sérine (suI<sup>+</sup>), comme glutamine (suII<sup>+</sup>) ou comme tyrosine (suIII<sup>+</sup>).

Nous avons cherché à déterminer le mode d'action d'un tel supresseur, en utilisant la souche d'*Escherichia coli* K12, 112-12 (Wollman), et son dérivé 112-121 qui porte une mutation «suppresseur d'amber».

Partant de l'idée courante selon laquelle la spécificité du mécanisme de lecture repose entièrement sur l'assortiment de RNA de transfert et d'enzymes d'activation d'acides aminés, Bollen a tout d'abord cherché à mettre en évidence une différence, à ce niveau, entre la souche bactérienne su<sup>-</sup>, 112-12 et la souche su<sup>+</sup> 112-121 qui en dérive par une simple mutation. Ses résultats ont été négatifs. L'évolution récente de nos idées et, en particulier, l'impression que les ribosomes participent, eux aussi, à la spécificité du mécanisme de lecture, nous a conduit à orienter ce travail vers la recherche de différences dans le comportement des *ribosomes* des deux souches (Bollen et Herzog, 1966; Herzog et Bollen, 1966; Bollen, Herzog, Burny, Marbaix et Huez, envoyé à *Biochim. Biophys. Acta*).

Herzog et Bollen ont tout d'abord étudié les courbes de dissociation des ribosomes de deux souches en leurs subunités 30S et 50S, en fonction de la concentration en Mg<sup>++</sup>. Ils ont constaté que ces courbes sont nettement distinctes (Bollen et Herzog, 1965). Ils ont ensuite répété ces expériences en utilisant des ribosomes préalablement hautement purifiés sur gradient de saccharose (Herzog et Bollen, 1965). Enfin, l'analyse des protéines ribosomiales par électrophorèse sur gel de polyacrylamide a révélé des différences entre les deux souches (Bollen, Herzog et Thomas, 1965).

Il était nécessaire d'identifier avec exactitude le supresseur présent dans la souche 112-121. S. Brenner a eu l'amabilité de déterminer la spécificité du supresseur de 112-121. Le triplet UAG est lu «glutamine» comme dans le cas du su<sup>+</sup><sub>II</sub> (le supresseur présent dans la souche C600). L'identification est confirmée par le fait que le spectre de suppression des mutants sus de λ par le supresseur de 112-121 est identique à celui du su<sup>+</sup><sub>II</sub> (C600) et différent de ceux du su<sup>+</sup><sub>I</sub> et du su<sup>+</sup><sub>III</sub> (C. Leurs).

Il était nécessaire, enfin, d'éliminer certaines possibilités de complication. L'une de ces possibilités est que la transition de 112-12 à 112-121 comporte deux mutations distinctes, l'une altérant la structure des ribosomes, l'autre étant la mutation supresseur elle-même. Une autre

possibilité serait que la mutation supprimeur soit déjà présente dans la souche 112-12, mais que son expression soit masquée par une altération de structure des ribosomes; la réversion vers un état plus normal des ribosomes rendrait au supprimeur son pouvoir. Pour tirer cette situation au clair, nous avons recouru à la transduction du supprimeur par le phage P1 et repris les expériences de dissociation des ribosomes en leurs subunités, sur les souches transduites (Herzog, Bollen et Thomas, envoyé à J. Mol. Biol.).

L'ensemble des résultats paraît bien indiquer que la suppression par  $su_{II}^+$  résulte d'une altération de la structure des ribosomes, et, par conséquent, que les ribosomes interviennent dans la détermination de la spécificité de la traduction.

#### 4 — PUBLICATIONS

##### 1961

- 1 — DELHAYE, M. et THOMAS, R.  
L'effet du chloramphénicol sur la multiplication du matériel génétique viral après induction d'une souche lysogène induite.  
Arch. Intern. Physiol. Bioch. **69**, 747-748.

##### 1962

- 2 — THOMAS, R.  
La structure et les fonctions des acides désoxyribonucléiques: études génétiques et chimiques.  
Masson (Paris) et Desoer (Liège) 102 pp.
- 3 — LECOINTE, J. et THOMAS, R.  
Effets de la température sur les étapes du développement d'un bactériophage tempéré.  
Arch. Intern. Physiol. Bioch. **70**, 404-405.
- 4 — THOMAS, R. et LAMBERT, L.  
On the occurrence of bacterial mutations permitting lysogenization by clear variants of temperate bacteriophages.  
J. Mol. Biol. **5**, 373-374.
- 5 — THOMAS, R. et LAMBERT, L.  
Données sur le rôle du génotype bactérien dans l'établissement de la lysogénie.  
Bull. Acad. roy. Belg., cl. sc. **48**, 666-670.
- 6 — THOMAS, R.  
Le sort du prophage après l'infection d'une bactérie lysogène par un bactériophage non co-immun.  
Bull. Acad. roy. Belg., cl. sc. **48**, 671-674.

##### 1963

- 7 — PEREIRA DA SILVA, L.H. et THOMAS, R. (a).  
La synthèse de l'acide désoxyribonucléique chez *Escherichia Coli*. III. Dissociation, par un changement de milieu, de la synthèse des acides désoxyribonucléiques et de celles des protéines et des acides ribonucléiques.  
Arch. Internat. Physiol. Bioch. **71**, 133-135.

- 8 — PEREIRA DA SILVA, L.H. et THOMAS, R. (b).  
La synthèse de l'acide désoxyribonucléique chez *Escherichia Coli*. IV. Réplication génétique sous inhibition de la synthèse des protéines et des acides ribonucléiques.  
Arch. Internat. Physiol. Bioch. **71**, 135-137.
- 9 — THOMAS, R.  
The control of genetic replication in temperate bacteriophages.  
Proc. XIth Internat. Congr. Genetics The Hague, **1**, 36.
- 1964**
- 10 — THOMAS, R.  
On the structure of the genetic segment controlling immunity in temperate bacteriophages.  
J. Mol. Biol. **8**, 247-253.
- 11 — HERZOG, A.  
An effect of streptomycin on the dissociation of *Escherichia Coli* 70S ribosomes.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. **15**, 172-176.
- 12 — HERZOG, A.  
L'action de la streptomycine sur les ribosomes de *Escherichia Coli*.  
Arch. Intern. Physiol. Bioch. **72**, 326-327.
- 13 — COUTURIER, M., DESMET, L. et THOMAS, R.  
High pleiotropy of streptomycin mutations in *Escherichia Coli*.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. **72**, 244-248.
- 14 — THOMAS, R. et BERTANI, L.E.  
On the control of the replication of temperate bacteriophages superinfecting immune hosts.  
Virology **24**, 241-253.
- 1965**
- 15 — BOLLER, A. et HERZOG, A.  
Altération du comportement des ribosomes à la suite d'une mutation « supersuppresseur ».  
Arch. Internat. Physiol. Bioch. **73**, 139-141.
- 16 — HERZOG, A. et BOLLEN, A.  
Altération du comportement des ribosomes à la suite d'une mutation « supersuppresseur ». II. Etude sur les ribosomes 70S purifiés.  
Arch. Internat. Physiol. Bioch. **73**, 526-527.
- 17 — BOLLEN, A., HERZOG, A. et THOMAS, R.  
Altération du comportement des ribosomes à la suite d'une mutation « supersuppresseur ». III. Etude électrophorétique des protéines ribosomiales.  
Arch. Intern. Physiol. Bioch. **73**, 557-558.
- 18 — THOMAS, R.  
Le contrôle de la réplication génétique et de l'expression des fonctions chez les bactériophages tempérés.  
Arch. Biol. **76**, 551-563.
- 19 — THOMAS, R.  
The control of genetic expression in temperate bacteriophages.  
Proc. Symp. on the Mutational Process, Prague 1965, 295-299.

1966

- 20 — THOMAS, R.  
Les interactions entre les virus tempérés et leur hôte.  
Rev. Française d'Etudes Cliniques et Biol. **11**, 19-21.
- 21 — BOLLEN, A. et HERZOG, A.  
A change in the protein complement of 30S ribosomes associated with an amber suppressor mutation.  
Abs. comm. third FEBS meeting, G40, Warsaw 1966.
- 22 — HERZOG, A. et BOLLEN, A.  
An effect of streptomycin on the ribosomes and its interference with the expression of a suppressor mutation.  
Abs. comm. third FEBS meeting, G44, Warsaw 1966.
- 23 — HERZOG, A., LOMBAERT, R. et HAMERS, R.  
Automatic optical scanning in density gradient centrifugations.  
Anal. Biochem. **14**, 149-152.
- 24 — EISEN, H.A., FUERST, C.R., SIMINOVITCH, L., PEREIRA DA SILVA, L., JACOB, F., DESMET-LAMBERT, L. et THOMAS, R.  
Genetics and physiology of defective lysogeny in *E. Coli* K12 ( $\lambda$ ): studies of early mutants.  
Virology **30**, 224-241.
- 25 — THOMAS, R.  
The control of development in temperate bacteriophages. I. Induction of prophage genes following heteroimmune superinfection.  
J. Mol. Biol. **22**, 79-95.

1967

- 26 — BOLLEN, A., HERZOG, A., BURNY, A., MARBAIX, G. et HUEZ, G.  
Transfer-RNA, activating enzymes and amber suppression.  
Biochim. Biophys. Acta **134**, 454-457.
- 27 — RADDING, Ch. M., SZPIRER, J. et THOMAS, R.  
The structural gene for  $\lambda$  exonuclease.  
Proc. Natl. Acad. Sci. US, **57**, 277-283.
- 28 — DAMBLY, C., COUTURIER, M. et THOMAS, R.  
Le contrôle de la synthèse du lysozyme chez les bactériophages tempérés.  
Arch. Internat. Physiol. Bioch., **75**, 155-156.
- 29 — HERZOG, A., BOLLEN, A. et GHYSEN, A.  
Chromatographie de protéines ribosomiales: extension de la méthode de Wahler.  
Arch. Internat. Physiol. Bioch. **75**, 165-166.
- 30 — NEERDAELS, P.  
Isolement d'un mutant « ochre » après traitement à l'hydroxylamine d'un mutant « amber » du bactériophage  $\lambda$ .  
Arch. Internat. Physiol. Bioch. **75**, 177-178.

- 31 — MOUSSET, S.  
Formation de particules hétérozygotes à double immunité lors de la surinfection d'une bactérie lysogène par un bactériophage hétéroimmun.  
Ann. Génét. **10**, 3-12.
- 32 — BRACHET, P. et GREEN, B.  
La réplication des mutants défectifs « précoces » du bactériophage  $\lambda$ .  
Arch. Internat. Physiol. Bioch. **75**, 357-359.
- 33 — LEFEBVRE, N. et TOUSSAINT, A.  
Induction par une acridine de mutations défectives d'un bactériophage lambdaïde.  
Arch. Internat. Physiol. Bioch. **75**, 365-366.
- 34 — VAN MONTAGU, M., LEURS, C., BRACHET, P. et THOMAS, R.  
A set of amber mutants of bacteriophages  $\lambda$  and MS2 suitable for the identification of suppressors.  
Mutation Res. **4**, 698-700.
- 35 — THOMAS, R., LEURS, C., DAMBLY, C., PARMENTIER, D. et LAMBERT, L.;  
BRACHET, P., LEFEBVRE, N., MOUSSET, S., PORCHERET, J., SZPIRER, J. et  
WAUTERS, D.  
Isolation and characterization of new sus (amber) mutants of bacteriophage  $\lambda$ .  
Mutation Res. **4**, 735-741.

## 5 — TITRES ACADEMIQUES ET SCIENTIFIQUES

R. Thomas a été nommé :

- titulaire de la Chaire Francqui à l'Université de Louvain (1963-1964)
- membre de la New York Academy of Sciences
- membre du Comité de Biophysique de l'Académie Royale de Belgique
- membre du « Groupe Européen de Chimiothérapie Anticancéreuse », dont il a organisé le Groupe de Biologie Moléculaire
- membre de l'European Molecular Biology Association.

Il a reçu le prix Théophile Gluge de l'Académie Royale de Belgique.

### *Organisation d'un symposium*

Un symposium européen de Génétique des Microorganismes a pu être organisé par R. Thomas, les 28, 29 et 30 mai 1963, à l'Université de Bruxelles, avec l'appui de l'Association Euratom-U.L.B.

Les sessions ont été présidées par le Dr. Hayes (Londres), le Dr. Bertani (Stockholm), les Professeurs Pontecorvo (Glasgow) et Kaudewitz (Berlin) et le Dr. Cuzin (Paris).

## 6 — DEPLACEMENTS

R. Thomas a été invité comme rapporteur à :

- la Gordon Conference sur les mécanismes de régulation (Andover, N.H., USA) 1964;
- la Gordon Conference sur les acides nucléiques (New Hampton, N.H., USA) 1966;
- au Symposium sur la lysogénie organisé par le N.I.H. à Warrenton (Virginie) en 1966.

Il a présidé des séances, notamment :

- au XI<sup>e</sup> Congrès International de Génétique (La Haye, 1963);
- au Symposium de Génétique humaine (Louvain, 1966);
- au Symposium sur la Lysogénie (Warrenton, Virginie, 1966).

Il a donné de nombreux séminaires et conférences, notamment :

- à l'Institut Pasteur de Paris (1963 et 1964);
- à la Carnegie Institution de Washington (Cold Spring Harbor, 1964);
- à l'Academia Sinica (Pékin et Shangai, 1964);
- aux Universités de Cologne, Genève, Francfort;
- à l'Institut Bordet et à l'Institut des Hautes Etudes à Bruxelles;
- à l'Institut d'Immunogénétique et Cancérologie (Villejuif, 1965);
- à l'Institut de Génétique et Biophysique de Naples;
- à l'Institut Supérieur de la Santé à Rome;
- à l'occasion de divers symposia (Mendel Memorial Symposium, Prague 1965; Phage meeting, Naples, 1965).

Une série de travailleurs du Laboratoire ont assisté à la réunion organisée à Paris à l'occasion du Cinquantenaire de la Société de Chimie Biologique. Ce sont : M<sup>me</sup> M. Couturier, M<sup>elles</sup> S. Mousset et D. Rimbert; MM. B. Barnhardt, A. Bollen, P. Brachet et A. Herzog.

S. Mousset a participé au cours de Génétique des Bactériophages organisé à Naples en 1964.

C. Chaudière et N. Douat ont assisté au Symposium de biologie moléculaire organisé à Luton (Grande-Bretagne) en 1965.

M. Couturier a assisté au « Phage meeting » de Naples en 1965 et y a fait un exposé.

P. Brachet a travaillé pendant quelques mois dans le laboratoire du Dr. F. Jacob à Paris (1965).

A. Bollen a participé à la première réunion de la « Federation of European Biochemical Societies » à Londres (1964).

A. Bollen et A. Herzog, Assistant, ont fait des exposés au 3<sup>e</sup> congrès de la même Fédération à Varsovie en 1966.

Ils ont fait un bref séjour dans le laboratoire du Dr. F. Gros à Paris en novembre 1964.

A. Herzog a été invité à faire une conférence au laboratoire de Physique de l'Istituto Superiore di Sanità (Rome, 1966).



## SEMINAIRES

### ANNEES 1962-1966

- 17 janvier 1962 — E. AMBELLAN (Columbia University).  
The effect of nucleotides on morphogenesis and RNA synthesis in Amphibian embryos.
- 31 janvier 1962 — J. DUMONT (U.L.B.).  
Etude *in vitro* du métabolisme de la cellule thyroïdienne et de son contrôle.
- 14 février 1962 — R. HAMERS (U.L.B.).  
Aspects moléculaires de la recombinaison chez le bactériophage T<sub>2</sub>.
- 28 février 1962 — A. CLAUDE (U.L.B.).  
Morphologie et organisation des constituants nucléaires : observations récentes au microscope électronique.
- 14 mars 1962 — R. LAVALLE (I.I.S.N.).  
Autorégulation cellulaire.
- 4 avril 1962 — A. ROLLER (California Inst. of Technology).  
Réplication et transfert à la descendance de l'ADN du phage infectant (T<sub>4</sub>).
- 9 mai 1962 — I. GIBSON (Inst. of Animal Genetics, Edinburgh).  
The metagen theory in *Paramecium aurelia*.
- 24 mai 1962 — D.M. PRESCOTT (Oak Ridge, Tennessee).  
Some studies on nuclear function and nuclear replication.
- 16 mai 1962 — S. PUISEUX-DAO (Sorbonne).  
Cycles comparés de l'*Acetabularia mediterranea* et du *Batophora Oerstedii* (Dasycladacées).
- 18 mai 1962 — D. MAZIA (Université de Californie).  
Recent experiments on DNA-polymerase in nuclei of sea urchin embryos at various developmental stages.
- 15 juin 1962 — J.H. MATTHAEI (Tübingen).  
RNA code and protein synthesis.
- 10 octobre 1962 — K. SHORTMAN (Paris).  
Métabolisme de l'ARN pendant l'adaptation respiratoire chez la levure.
- 24 octobre 1962 — H. SCHERBAUM (Dept Zoology, UCLA, Calif.).  
Synchronized cell division in *Tetrahymena pyriformis*.

- 7 novembre 1962 — M<sup>me</sup> DE DEKEN-GRENSON (U.L.B.).  
Comment se pose actuellement le problème de l'hérédité cytoplasmique. Expériences récentes.
- 21 novembre 1962 — J. BRACHET (U.L.B.).  
Acides nucléiques et morphogénèse : œufs d'Amphibiens et Acetabularia.
- 5 décembre 1962 — E. TRIPLETT (Univ. of California).  
The development of immunological self recognition systems.
- 19 décembre 1962 — M<sup>me</sup> DE DEKEN-GRENSON (U.L.B.).  
Comment se pose actuellement le problème de l'hérédité cytoplasmique. Expériences récentes (2<sup>e</sup> partie).
- 16 janvier 1963 — J.S. FRUTON (Yale University).  
Enzyme-catalyzed transamidation reactions.
- 30 janvier 1963 — J.L. PASTEELS (U.L.B.).  
Ultra-structures de l'œuf de la Pholade aux premiers stades du développement.
- 6 février 1963 — M. MULLER.  
Cytochemical and ultrastructures studies on food vacuoles of certain free-living protozoa.
- 20 février 1963 — R. THOMAS (U.L.B.).  
Les mutations du type supprimeur.
- 13 mars 1963 — A. NOVICK (Institut Pasteur).  
Studies on the nature of repressor.
- 27 mars 1963 — W. FIERS (Université de Gand).  
Chemical structure and biological activity of the bacteriophage ØX-174 DNA.
- 27 mars 1963 — J. MARMUR (Brandeis Univ. — Mass. USA).  
The biological and physical chemical properties of Bacillus bacteriophage DNA.
- 24 avril 1963 — W. VAHS (Cologne).  
Basic proteins as effective agents in the embryonic induction process.
- 8 mai 1963 — C. BAGLIONI (Naples).  
Contributions of studies on human abnormal hemoglobins to molecular biology.
- 20 mai 1963 — S. COHEN (Philadelphie).  
The synthesis in bacteria of messenger RNA without protein synthesis.
- 11 octobre 1963 — I. AGRELL (Univ. Lund).  
Division synchrony and mitotic gradient.
- 30 octobre 1963 — W. BEERMANN (Tübingen).  
Nucleo-cytoplasmic interrelations as studied in Chironomus polythene chromosomes.
- 6 novembre 1963 — T. BIBRING (Berkeley, Univ. of Calif.).  
Studies on the replication cycle of centrioles and the interaction of centrioles and chromosomes.

- 21 novembre 1963 — J.E. EDSTROM (Univ. of Göteborg).  
Microelectrophoretic nucleic acid analyses in the study of nucleocytoplasmic relations.
- 8 janvier 1964 — A. KORNER (Univ. of Cambridge).  
Growth hormone control of protein and messenger RNA synthesis.
- 5 février 1964 — P. FREDERICQ (Univ. de Liège).  
Génétique des facteurs colicinogènes.
- 25 mars 1964 — R. JEENER (U.L.B.).  
Premières tentatives de recherches sur la nature et l'origine de la spécificité des anticorps.
- 5 mai 1964 — G. BERNARDI (Strasbourg).  
Etudes sur la désoxyribonucléase acide.
- 6 mai 1964 — A.S. KELUS (Birmingham).  
Immunogenetics of plasma proteins.
- 8 mai 1964 — S. SPIEGELMAN (Univ. of Illinois, USA).  
Discussion sur les méthodes d'hybridation DNA/RNA.
- 11 juin 1964 — E. KANAREK (U.L.B.).  
Structure de la fumarase en solution.
- 23 juin 1964 — H.T. EPSTEIN (Naples).  
Recherches sur les Euglènes.
- 8 octobre 1964 — M. FELDMAN (Rehovoth).  
The stabilization of m-RNA in muscle cell differentiation *in vitro*.
- 9 octobre 1964 — D. MAZIA (Berkeley, Calif.).  
Interpretation of the chromosome; some recent experiments on fine structure and enzyme activities.
- 27 octobre 1964 — R. MONIER (Marseille).  
RNA ribosomiques et structure des ribosomes.
- 4 novembre 1964 — A. WAKSMAN (U.L.B.).  
Quelques réflexions sur les interactions protéine-protéine.
- 10 novembre 1964 — A. SELS (U.L.B.).  
Hémoprotéines du système respiratoire et leur régulation.  
Différence entre les mécanismes de la biosynthèse induite de l'iso-1-cytochrome c et de l'iso-2-cytochrome c.
- 25 novembre 1964 — K. SCHERRER (Paris).  
Synthèse des RNA dans les Erythroblastes aviaires.
- 1 décembre 1964 — L. SACHS (Rehovoth).  
The *in vitro* analysis of carcinogenesis.
- 16 décembre 1964 — J.P. EBEL (Univ. de Strasbourg).  
Influence de plusieurs modifications chimiques des acides ribonucléiques de transfert sur leur activité biologique.

- 13 janvier 1965 — R.P. PERRY (Philadelphie).  
The nucleolus and the synthesis of ribosomes.
- 15 janvier 1965 — F. GROS (Inst. Biol. physico-chimique, Paris).  
RNA messenger et mécanismes de régulation.
- 26 janvier 1965 — G.F. LEONG (San Francisco).  
Humoral control of DNA synthesis in regenerating rat liver.
- 17 mars 1965 — P. BOURGAUX (U.L.B.).  
Transformation *in vitro* par le virus du polyome.
- 23 mars 1965 — C. LIEBECQ (Univ. de Liège).  
Recherches sur l'adénosine tétraphosphate.
- 22 mars 1965 — H. CHANTRENNE (U.L.B.).  
Sur les méthodes biochimiques de déchiffrement du code génétique.
- 28 avril 1965 — E. SIGNER (Inst. Pasteur, Paris).  
Transduction spécifique par le phage 80.
- 4 mai 1965 — H.G. HERS (Univ. de Louvain).  
La biochimie pathologique du glycogène.
- 7 mai 1965 — P. DESNUELLE (Univ. de Marseille).  
Adaptation des enzymes du pancréas chez le rat.
- 11 mai 1965 — D. KAISER (Cambridge).  
The cohesive ends of DNA from bacteriophage.
- 18 mai 1965 — E. FREDERICQ (Univ. de Liège).  
Structure et les interactions des nucleohistones du thymus.
- 9 juin 1965 — I.B. DAWID (Tübingen).  
DNA in amphibian eggs.
- 14 juin 1965 — C. TANFORD (Duke University, USA).  
Protein structure and denaturation.
- 15 juin 1965 — C. TANFORD (Duke University, USA).  
Chemical basis for antibody specificity.
- 26 octobre 1965 — A.B. NOVIKOFF (A. Einstein College of Med., N.Y.).  
Intracellular enzyme localization : biochemical and cytochemical approaches.
- 10 novembre 1965 — H. DENIS (Univ. de Liège).  
L'activité des gènes durant le développement embryonnaire.
- 1 mars 1966 — F. CHAPEVILLE (Saclay).  
Quelques enzymes « vestigiaires » au cours du développement embryonnaire.
- 7 mars 1966 — O. MAALØE (Univ. de Copenhague).  
State and function of the bacterial nucleus.

- 8 mars 1966 — O. MAALØE (Univ. de Copenhague).  
Relation between nuclear and cellular division in *E. coli*.
- 11 mars 1966 — A. REALE (Ist. Sup. di Sanita, Roma).  
Quelques études récentes sur la physiologie cellulaire et sur les propriétés des acides nucléiques.
- 15 mars 1966 — L.H. PEREIRA DA SILVA (Inst. Pasteur, Paris).  
Le contrôle des fonctions précoces des bactériophages tempérés.
- 25 mars 1966 — A. CAMPBELL (Univ. de Rochester).  
Steric effects in lysogenization.
- 19 avril 1966 — J.A. COHEN (Rijswijk).  
Transformation des bactériophages T4.
- 26 avril 1966 — J. BRACHET (U.L.B.).  
Morphogénèse et synthèse des protéines en l'absence du noyau cellulaire.
- 10 mai 1966 — B. KASSANIS (Harpenden, England).  
Research on the satellite virus STNV.
- 13 mai 1966 — G. SIEBERT (Univ. de Mayence).  
Metabolic studies on isolated nuclei.
- 20 mai 1966 — J. TOMIZAWA (Nat. inst. of Health, Tokyo).  
Immunity of phage  $\lambda$  studied with non lysogenic cells.  
Molecular mechanisms of genetic recombination of bacteriophage.
- 31 mai 1966 — R.L. HILL (Duke University).  
Studies on the structure of heavy chains of  $\gamma$ -globulins.
- 22 juin 1966 — H. CHANTRENNE (U.L.B.).  
Echos du Symposium de I.unteren sur le contrôle de la synthèse des acides nucléiques et des protéines.

#### SEMINAIRES DE LA LICENCE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

- 25 février 1963 — G. MARBAIX.  
Les méthodes d'isolement et d'étude des ARN de transfert.
- 11 mars 1963 — J. ZANEN.  
Procédés chromatographiques et application des échangeurs de cellulose modifiée.
- 25 novembre 1963 — R. THOMAS.  
La dégénérescence du code.
- 2 décembre 1963 — A. BURNY.  
Données physico-chimiques sur les ARN.
- 9 décembre 1963 — G. MARBAIX.  
Les RNA de transfert.

- 16 décembre 1963 — A. BOLLEN.  
Les RNA de transfert : bases rares.
- 6 janvier 1964 — R. THOMAS.  
Les mutations « nonsense ».
- 13 janvier 1964 — H. GROSJEAN.  
Les enzymes d'activation des acides aminés.
- 20 janvier 1964 — R. THOMAS.  
Les modifications induites par l'hôte chez les bactériophages.
- 27 janvier 1964 — G. VANSANTEN.  
Structure de la molécule de la  $\gamma$ -globuline.
- 11 février 1964 — R. HAMERS.  
Structure du site actif des anticorps (1<sup>re</sup> partie).
- 18 février 1964 — R. HAMERS.  
Idem (2<sup>e</sup> partie).
- 2 mars 1964 — M. THILLY.  
Pléiotropie des mutations résistantes à la streptomycine chez *E. coli*.
- 23 mars 1964 — E. SCHRAM.  
Les protéines structurales des ribosomes.
- 20 avril 1964 — H. CHANTRENNE.  
Potins d'Amérique.
- 14 décembre 1964 — R. THOMAS.  
Gènes régulateurs.
- 4 janvier 1965 — R. THOMAS.  
Gènes régulateurs et opérateurs (suite).
- 11 janvier 1965 — H. CHANTRENNE.  
RNA messagers.
- 18 janvier 1965 — H. CHANTRENNE.  
Polyribosomes.
- 25 janvier 1965 — R. THOMAS.  
L'immunité des bactéries lysogènes. I.
- 1 février 1965 — R. THOMAS.  
L'immunité des bactéries lysogènes. II. Le contrôle de la réplication.
- 8 février 1965 — R. THOMAS.  
L'immunité des bactéries lysogènes. III. Interactions entre le contrôle de l'expression et le contrôle de la réplication.

- 22 février 1965 — A. HERZOG.  
Intervention des ribosomes dans la spécificité de la traduction.
- 1 mars 1965 — A. SELS.  
Théorie de Michaelis-Menten.
- 15 mars 1965 — A. SELS.  
Cinétique enzymatique — Théorie de Michaelis-Menten (suite).  
Réaction à deux substrats — Mécanismes d'inhibition.
- 22 mars 1965 — H. CHANTRENNE.  
Sur les méthodes biochimiques de déchiffrement du code génétique.
- 26 avril 1965 — R. THOMAS.  
Les triplets « nonsense » ou de terminaison de chaînes. I.
- 3 mai 1965 — R. THOMAS.  
Les triplets « nonsense » ou de terminaison de chaînes. II.
- 17 janvier 1966 — R. THOMAS.  
Déphasage de la traduction par les mutations « acridine ».
- 24 janvier 1966 — R. THOMAS.  
Les codons de terminaison de chaîne.
- 31 janvier 1966 — J. WERENNE.  
Interactions acridines — acides nucléiques.
- 7 février 1966 — H. CHANTRENNE.  
Nouvelles méthodes biochimiques de déchiffrement du code.
- 14 mars 1966 — H. CHANTRENNE.  
Synthèse d'ARN sans synthèse concomitante de protéines chez les bactéries.
- 21 mars 1966 — R. THOMAS.  
Contrôle de la synthèse du DNA.
- 25 avril 1966 — A. SELS.  
La mitochondrie — 1/ Structure et fonction.
- 9 mai 1966 — A. SELS.  
La mitochondrie — 2/ Information génétique portée par la mitochondrie.
- 16 mai 1966 — A. HERZOG.  
Les supprimeurs bactériens et leurs sites d'action.
- 23 mai 1966 — A. SELS.  
La mitochondrie — 3/ Information génétique portée par la mitochondrie (suite).

SEMINAIRES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE  
DONNES PAR LE PROFESSEUR S. SPIEGELMAN

(Univ. of Illinois, Urbana, USA)

13 mai 1964.

The T<sub>2</sub>-*E. coli* complex as an experimental system : the detection of viral specific message by DNA-RNA hybridization.

20 mai 1964.

The selective synthesis of cellular messages.

27 mai 1964.

The origin of ribosomal and s-RNA and the problem of translational suppressors.

3 juin 1964.

The control of frequency and strand selection in the generation of genetic messages from DNA.

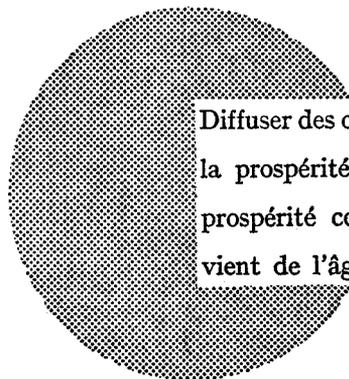
#### AVIS AU LECTEUR

Tous les rapports Euratom sont signalés, au fur et à mesure de leur publication, dans le périodique mensuel **EURATOM INFORMATION**, édité par le Centre d'information et de documentation (CID). Pour souscrire un abonnement (1 an : FF 75, FB 750) ou recevoir un numéro spécimen, prière d'écrire à :

**Handelsblatt GmbH**  
**"Euratom Information"**  
**Postfach 1102**  
**D-4 Düsseldorf (Allemagne)**

ou à

**Office de vente des publications**  
**des Communautés européennes**  
**2, Place de Metz**  
**Luxembourg**



Diffuser des connaissances c'est distribuer de la prospérité — j'entends la prospérité collective et non la richesse individuelle — et cette prospérité contribue largement à la disparition du mal qui nous vient de l'âge des ténèbres.

Alfred Nobel

## BUREAUX DE VENTE

Tous les rapports Euratom sont vendus dans les bureaux suivants, aux prix indiqués au verso de la première page de couverture (lors de la commande, bien indiquer le numéro EUR et le titre du rapport, qui figurent sur la première page de couverture).

### OFFICE CENTRAL DE VENTE DES PUBLICATIONS DES COMMUNAUTES EUROPEENNES

2, place de Metz, Luxembourg (Compte chèque postal N° 191-90)

#### BELGIQUE — BELGIË

MONITEUR BELGE  
40-42, rue de Louvain - Bruxelles  
BELGISCH STAATSBAD  
Leuvenseweg 40-42, - Brussel

#### LUXEMBOURG

OFFICE CENTRAL DE VENTE  
DES PUBLICATIONS DES  
COMMUNAUTES EUROPEENNES  
9, rue Goethe - Luxembourg

#### DEUTSCHLAND

BUNDESANZEIGER  
Postfach - Köln 1

#### NEDERLAND

STAATSDRUKKERIJ  
Christoffel Plantijnstraat - Den Haag

#### FRANCE

SERVICE DE VENTE EN FRANCE  
DES PUBLICATIONS DES  
COMMUNAUTES EUROPEENNES  
26, rue Desaix - Paris 15<sup>e</sup>

#### ITALIA

LIBRERIA DELLO STATO  
Piazza G. Verdi, 10 - Roma

#### UNITED KINGDOM

H. M. STATIONERY OFFICE  
P. O. Box 569 - London S.E.1

EURATOM — C.I.D.  
51-53, rue Belliard  
Bruxelles (Belgique)