

EUR 569.f

MAY 28 1964

REPRINT

ASSOCIATION
COMMUNAUTÉ EUROPÉENNE DE L'ÉNERGIE ATOMIQUE - EURATOM
UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES - U.L.B.

**MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES
ET DES PROTÉINES CHEZ LES EMBRYONS
NORMAUX ET LES HYBRIDES LÉTAUX
ENTRE ÉCHINODERMES**

par

A. FICQ et J. BRACHET

1964



Contrat N° 016-61-10 ABIB

Article paru dans
EXPERIMENTAL CELL RESEARCH
32 - 1963

AVERTISSEMENT

Le présent document a été élaboré sous les auspices de la Commission de la Communauté Européenne de l'Energie Atomique (EURATOM).

Il est précisé que la Commission d'EURATOM, ses cocontractants ou toute personne agissant en leur nom :

- 1° — 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 décrit dans le présent document ne portent pas atteinte à des droits privés;
- 2° — N'assument aucune responsabilité pour les dommages qui pourraient résulter de l'utilisation d'informations, d'équipement, de méthodes ou procédés divulgués dans le présent document.

This reprint is intended for restricted distribution only. It reproduces, by kind permission of the publisher, an article from "EXPERIMENTAL CELL RESEARCH", 32 - 1963, 90-108. For further copies please apply to Academic Press Inc. — 111 Fifth Avenue - New York 3, N.Y. (U.S.A.).

Dieser Sonderdruck ist für eine beschränkte Verteilung bestimmt. Die Wiedergabe des vorliegenden in „EXPERIMENTAL CELL RESEARCH“, 32 - 1963, 90-108 erschienenen Aufsatzes erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Herausgebers. Bestellungen weiterer Exemplare sind an Academic Press Inc. — 111 Fifth Avenue - New York 3, N.Y. (U.S.A.), zu richten.

Ce tiré-à-part est exclusivement destiné à une diffusion restreinte. Il reprend, avec l'aimable autorisation de l'éditeur, un article publié dans «EXPERIMENTAL CELL RESEARCH», 32 - 1963, 90-108. Tout autre exemplaire de cet article doit être demandé à Academic Press Inc. 111 Fifth Avenue - New York 3, N.Y. (U.S.A.).

Questo estratto è destinato esclusivamente ad una diffusione limitata. Esso è stato riprodotto, per gentile concessione dell'Editore, da «EXPERIMENTAL CELL RESEARCH», 32 - 1963, 90-108. Ulteriori copie dell'articolo debbono essere richieste a Academic Press Inc. — 111 Fifth Avenue - New York 3, N.Y. (U.S.A.).

Deze overdruk is slechts voor beperkte verspreiding bestemd. Het artikel is met welwillende toestemming van de uitgever overgenomen uit „EXPERIMENTAL CELL RESEARCH“, 32 - 1963, 90-108. Meer exemplaren kunnen besteld worden bij Academic Press Inc. — 111 Fifth Avenue - New York 3, N.Y. (U.S.A.).

MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES ET DES PROTÉINES CHEZ LES EMBRYONS NORMAUX ET LES HYBRIDES LÉTAUX ENTRE ECHINODERMES¹

A. FICQ et J. BRACHET

Laboratoire de Morphologie animale, Faculté des Sciences, Université libre de Bruxelles, Belgique

Reçu le 22 novembre 1962

LE métabolisme des hybrides létaux entre Batraciens a fait l'objet de plusieurs études de l'un de nous (J. B. [10, 11, 12, 13]). Des observations cytochimiques sur la distribution des acides nucléiques chez les hybrides entre Anoures [11] et entre Urodèles [29] ont montré que l'introduction d'un spermatozoïde étranger a pour conséquence de produire une mosaïque de noyaux inégalement riches en acides ribonucléique (RNA) et désoxyribonucléique (DNA). Certains noyaux contiennent un excédent de RNA et leur chromatine est rejetée à la périphérie; d'autres, au contraire, ne contiennent guère que du DNA. Quelques noyaux, enfin, semblent posséder une proportion relativement normale de RNA et de DNA. Tout se passe comme si de nombreux noyaux, dans les hybrides létaux, fabriquaient un excédent de RNA qui, en raison d'une composition ou d'une structure anormale, ne pourrait migrer vers le cytoplasme et y jouer son rôle dans la synthèse des protéines [11]. Notons encore que, chez les hybrides entre Batraciens, le blocage du développement ne peut s'expliquer par un arrêt de la synthèse du DNA : les dosages de Gregg et Løvtrup [18] et les expériences d'autoradiographie de Tencer [28] excluent formellement cette hypothèse.

Plus récemment, nous avons pu montrer [13] qu'il est possible de modifier la proportion relative du DNA et du RNA dans les noyaux des hybrides létaux entre Batraciens en traitant les embryons par divers substrats du cycle tricarboxylique ou par de l'acide adénosinetriphosphorique (ATP). D'autre part, nous avons pu établir, dans le même travail, que l'utilisation de l'uridine pour la synthèse du RNA et, surtout, pour celle du DNA est fortement réduite, chez l'hybride létaux. Le RNA nucléaire de ces hybrides présente une solubilité excessive, ce qui confirme l'idée qu'il doit être anormal (« nonsense RNA »).

Ces observations nous ont amenés à faire quelques hypothèses sur la

¹ Travail effectué dans le cadre du Contrat d'Association Euratom, Université libre de Bruxelles 016-61-10-ABIB.

nature des lésions biochimiques dont souffrent les hybrides létaux [13] : d'une part, ces hybrides (dont on sait que le métabolisme glucidique est déficient) seraient incapables de maintenir normalement l'équilibre entre les formes oxydées et réduites du triphosphopyridine-nucléotide (TPN⁺/TPNH). Dès lors, l'embryon létalement éprouverait des difficultés à réduire le ribose en désoxyribose, réaction qui exige la production continue de TPNH : il en résulterait nécessairement un déséquilibre dans la production relative de DNA et de RNA dans les noyaux. D'autre part, on peut imaginer la possibilité que, dans les hybrides létaux, il se forme des *molécules hybrides de DNA* : une hélice du DNA d'une espèce s'associerait avec une hélice du DNA de l'autre espèce. La conséquence de ces appariements illégitimes pourrait être, suivant leur fréquence, soit la production de « RNA messagers » anormaux qui seraient incapables de quitter le DNA, soit l'arrêt total de la synthèse des RNA messagers. Dans le premier cas, il se formerait des noyaux anormalement riches en RNA; dans le second, les noyaux seraient presque dépourvus de DNA. Ainsi s'expliquerait la mosaïque de noyaux que révèle l'examen cytochimique.

Si ces hypothèses correspondent à une réalité, elles doivent être valables pour tous les hybrides frappés d'une létalité précoce : c'est ce qui nous a incités à étudier les oursins, où de nombreuses combinaisons d'hybrides ont été décrites et analysées par Baltzer et ses collaborateurs [1-5, 14, 15]. Parmi elles, la combinaison létale *Paracentrotus* ♀ × *Arbacia* ♂ (*P* ♀ × *A* ♂) nous a semblé particulièrement intéressante parce qu'elle a déjà été analysée au double point de vue cytologique [1, 5] et biochimique [2, 4, 14, 15]. Les embryons hybrides (*P* ♀ × *A* ♂) se bloquent au stade gastrula, restent encore vivants pendant quelques heures, puis dégénèrent rapidement: on observe alors une abondante pycnose nucléaire.

Pendant les 16 premières heures, le développement de ces hybrides est normal et du type maternel en ce qui concerne la consommation d'O₂ et la synthèse du DNA. Ensuite, et jusqu'à l'arrêt de la gastrulation, vers la 40ème heure, la respiration et la synthèse du DNA sont progressivement ralenties.

L'analyse chromatographique [14] a montré qu'il existe des différences spécifiques en ce qui concerne les acides aminés libres et les peptides, mais non en ce qui concerne les protéines. Chez les hybrides (*P* ♀ × *A* ♂), le « pool » d'acides aminés libres est de caractère maternel.

Dans la même combinaison, et par des méthodes immunologiques, Harding *et al.* [20] ont cependant pu déceler des antigènes paternels dans les blastulas hybrides, peu de temps avant leur blocage. La combinaison

réci-proque, *Arbacia* ♀ × *Paracentrotus* ♂ (A ♀ × P ♂) a également été réalisée [3]; dans ce cas, certains des embryons hybrides peuvent poursuivre leur développement jusqu'au stade pluteus. Pour ces deux types d'hybrides, un rendement de fécondations réussies d'environ 10 % est largement suffisant pour permettre une étude cytochimique et autoradiographique.

Signalons que de telles études ont été entreprises précédemment sur *Paracentrotus* [7, 17, 21, 22, 23, 24]. Markman [23] a observé, par autoradiographie, une incorporation d'adénine-¹⁴C et de leucine-¹⁴C plus élevée dans les moitiés animales que dans les moitiés végétatives de jeunes blastulas. Utilisant un hydrolysat de *Chlorelles*-¹⁴C et des acides aminés, Immers a fait des observations analogues [21, 22]. Bosco et Monroy [7], au moyen de méthionine, de leucine et d'alanine marquées, sont arrivés à des conclusions opposées. Nos propres recherches [17] ont porté plus particulièrement sur les premiers stades du développement. Une incorporation précoce et très élevée de thymidine pendant le clivage semble montrer qu'une synthèse rapide de DNA débute très peu de temps après la fécondation. La radioactivité des précurseurs du RNA est, elle aussi, strictement limitée aux noyaux à ce stade; nous avons supposé qu'il pourrait s'agir d'un RNA transporteur d'information, en contact étroit avec le DNA.

Dans le présent travail, notre but a été de suivre, au moyen de nucléosides et d'acides aminés marqués, les troubles du métabolisme des acides nucléiques et des protéines, provoqués par l'hybridation : nous avons donc comparé le taux de l'incorporation des précurseurs radioactifs et leur distribution intracellulaire chez les hybrides et chez les embryons témoins des deux espèces parentales *Paracentrotus* ♀ × *Paracentrotus* ♂ (P ♀ × P ♂) et *Arbacia* ♀ × *Arbacia* ♂ (A ♀ × A ♂).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les oursins (*Paracentrotus lividus* et *Arbacia lixula*) ont été récoltés par les soins de la Station Zoologique de Villefranche sur Mer (France) et expédiés, par avion, au Laboratoire, en « container » réfrigéré.¹ Le pourcentage élevé des fécondations, dans les expériences de contrôle (P ♀ × P ♂ et A ♀ × A ♂), permet d'affirmer que les oursins étaient en excellente condition lors de leur arrivée à Bruxelles.

Neuf expériences ont été effectuées, de décembre 1961 à juin 1962. Les résultats, dans l'ensemble, ont été reproductibles et ne semblent pas avoir été affectés par des variations saisonnières.

Les œufs ont été prélevés et fécondés selon le procédé décrit par Scarano *et al.* [26].

¹ Tous nos remerciements vont au Dr. R. Lallier, qui a eu la grande amabilité de se charger de l'expédition des oursins.

Pour les fécondations interspécifiques, nous avons suivi les techniques utilisées par Baltzer *et al.* [1, 3].

Les précurseurs radioactifs choisis ont été, pour l'étude des acides nucléiques : la thymidine-³H, l'uridine-³H et l'adénosine-³H; pour celle des protéines : la phénylalanine-¹⁴C, la leucine-¹⁴C et la leucine-³H.¹

L'incubation dans de l'eau de mer radioactive (2 μ C/ml de suspension d'œufs) a été effectuée à 18°C. Dans certains cas, l'administration du radio-isotope s'est faite en traitant les embryons de façon continue, dans le milieu de culture radioactif. Dans d'autres cas, on a procédé à un marquage discontinu (« pulses » d'1 heure, à chaque stade du développement embryonnaire). Dans d'autres cas, encore, après avoir cultivé les embryons pendant 1 heure en présence de la molécule radioactive, on a procédé à leur démarquage (chase) en les reportant dans de l'eau de mer non marquée, pendant une durée de 2 à 5 heures. Des échantillons ont été prélevés aux stades suivants : (1) 1-2-4 cellules; (2) 8 à 64 cellules; (3) stade blastula avec mésenchyme; et (4) stade gastrula, avec formation plus ou moins complète du tube digestif.

Les échantillons (5 ml de suspension) ont été centrifugés modérément à la main et lavés. La fixation par l'alcool acétique (5:1) a été suivie d'un lavage à l'alcool à 70° pendant 12 heures. La déshydratation et l'enrobage ont été effectués selon les procédés classiques. Des coupes de 5 à 7 μ ont été disposées sur des lames préalablement préparées pour l'autoradiographie.

Certaines préparations ont été traitées par la ribonucléase, d'autres, par la désoxyribonucléase (RNase Sigma : 0,2 mg/ml dans un tampon Tris à pH 7.5 pendant 1 heure à 37°C. DNase Worthington : 0.1 mg/ml dans un tampon Tris à pH 7.5 + MgCl₂ M/300 pendant 3 heures à 37°C). D'autres préparations ont été traitées par une solution à 3 % d'acide perchlorique (PCA) à 0°C pendant 20 min, puis elles ont été lavées. D'autres lames (témoins) n'ont subi aucun traitement.

Le procédé autoradiographique a été décrit précédemment [16] (Emulsion Ilford K₂ in Gel Form). Un comptage des grains d'Ag de l'autoradiogramme a été effectué au microscope; les chiffres ont été rapportés à la surface des différents éléments cellulaires (noyau et cytoplasme).

Lors de chaque expérience, des embryons (témoins et hybrides) ont été également fixés au Zenker acétique. Les coupes ont été colorées au Feulgen et à l'Unna afin de suivre, avec plus de précision que ne le permet la technique autoradiographique, la localisation intracellulaire des deux types d'acides nucléiques.

RÉSULTATS

Observations cytochimiques

Au stade morula, rien ne permet de distinguer les hybrides létaux (P ♀ × A ♂) des témoins (P ♀ × P ♂) : les noyaux et les chromosomes sont bien

¹ Thymidine-³H : radioactivité spécifique 100 mC/mM; uridine-5-³H : radioactivité spécifique 50 mC/mM; adénosine-³H : radioactivité spécifique 100 mC/mM; DL-3-phénylalanine-2-¹⁴C : radioactivité spécifique 2 mC/mM; DL-leucine-1-¹⁴C : radioactivité spécifique 5 mC/mM; DL-leucine-4-5-³H : radioactivité spécifique 500 mC/mM; (Radiochemical Centre, Amersham, England).

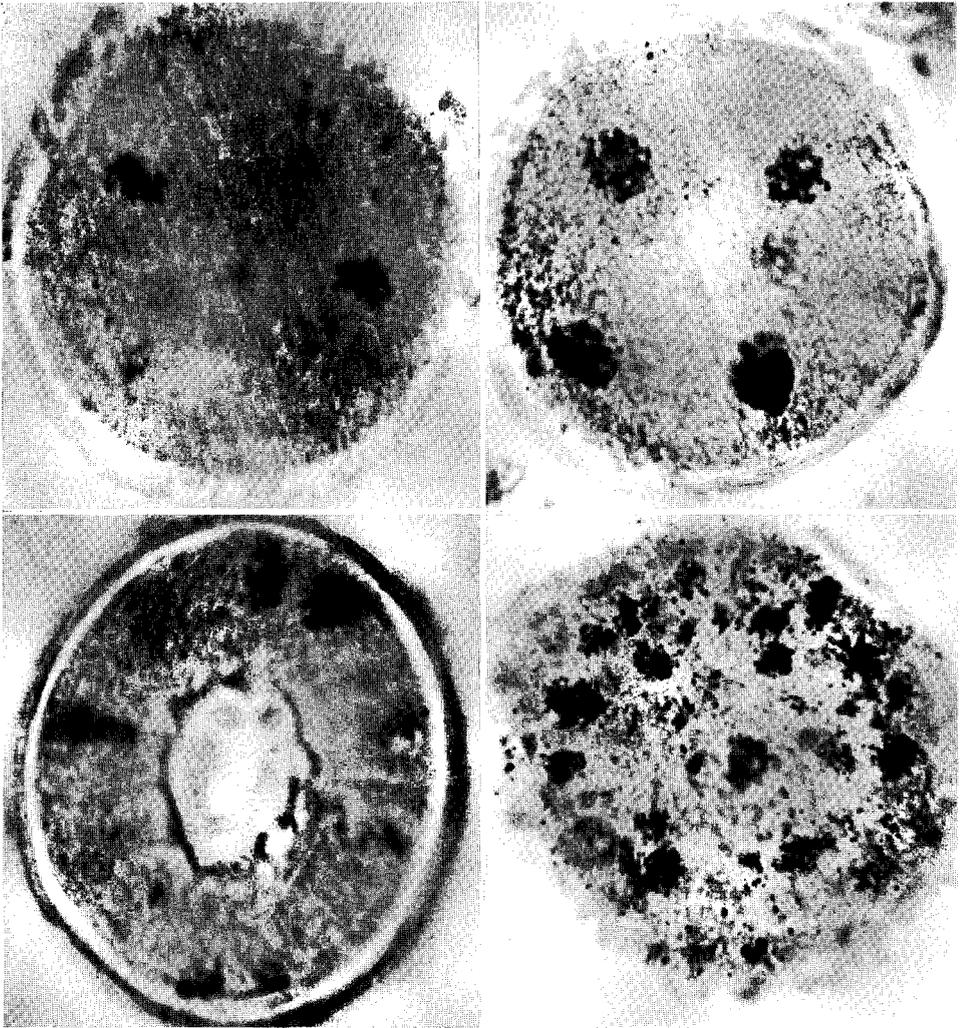


Planche 1.—Autoradiographies de coupes d'embryons de *Paracentrotus* ♀ × *Paracentrotus* ♂ à différents stades du développement, marqués par la thymidine-³H.

colorables au Feulgen, le cytoplasme est fortement basophile. Pas plus que Baltzer [3], nous n'avons observé d'images d'élimination de la chromatine dans le cytoplasme.

Lorsque, au bout de quelques heures de développement, les témoins ont atteint le stade de la blastula nageante, leurs noyaux se colorent intensément au Feulgen; à l'Unna, ces noyaux se teignent en bleu et on y reconnaît de

petits nucléoles colorés à la pyronine. L'aspect des hybrides létaux est alors bien différent : souvent, le blastocèle contient déjà quelques cellules à noyau pycnotique. Mais ce qui frappe surtout, c'est le *polymorphisme* des noyaux qui, comme chez les Batraciens, forment une véritable mosaïque : certaines cellules ont des noyaux colorés en bleu à l'Unna; leur chromatine est fortement condensée, les nucléoles sont très peu apparents ou inexistantes. D'autres cellules, au contraire, ont de gros noyaux vésiculeux, avec des nucléoles très apparents. Comme chez les Batraciens, la chromatine de ces noyaux anormalement riches en RNA tend à être rejetée sous la membrane nucléaire.

Ces deux types de noyaux, qui se reconnaissent aisément tant au Feulgen qu'à l'Unna, se rencontrent encore dans les embryons létaux (pour autant que la cytolyse n'y ait pas débuté) au moment où les témoins sont devenus des gastrulas avancées. Toutefois, les noyaux à chromatine condensée — qui évoluent souvent vers la pycnose — forment maintenant la majorité par rapport aux noyaux volumineux, pourvus de gros nucléoles riches en RNA.

Observations autoradiographiques

Les tableaux (I à VIII) et les microphotos (Planches 1 à 5) rendent compte de nos résultats. Que peut-on conclure de ces données?

DNA. (Thymidine.) — Tant les expériences d'incorporation continue que celles de « pulses » de thymidine-³H confirment les résultats que nous avons obtenus antérieurement [17] sur des embryons normaux ($P \text{♀} \times P \text{♂}$) aux différents stades du développement. Les embryons $A \text{♀} \times A \text{♂}$, qui sont de taille plus petite, incorporent plus de thymidine dans leurs noyaux, quel que soit le stade, que les embryons $P \text{♀} \times P \text{♂}$ (Planches 1 et 2). Les embryons hybrides $P \text{♀} \times A \text{♂}$, quand ils ont un aspect relativement normal, présentent un type d'incorporation intermédiaire entre les types maternel et paternel ($P \text{♀} \times P \text{♂} < P \text{♀} \times A \text{♂} < A \text{♀} \times A \text{♂}$). La plupart des hybrides, cependant, incorporent la thymidine *de façon irrégulière et anarchique* : les noyaux très boursoufflés, sont marqués à la périphérie. Dans certains cas, on observe une radioactivité *extranucléaire* qui pourrait correspondre à une élimination de chromatine (Planche 3).

Dans les expériences de « pulses », où la thymidine était administrée pendant 1 heure à chaque stade, les différences observées entre $P \text{♀} \times P \text{♂}$ et $P \text{♀} \times A \text{♂}$ se sont retrouvées : le marquage présente les mêmes caractéristiques que lorsque le précurseur est administré de façon continue. Lors des expériences de « chase », on observe que le report des embryons marqués, dans de l'eau de mer « froide », n'altère ni la distribution, ni la quantité de

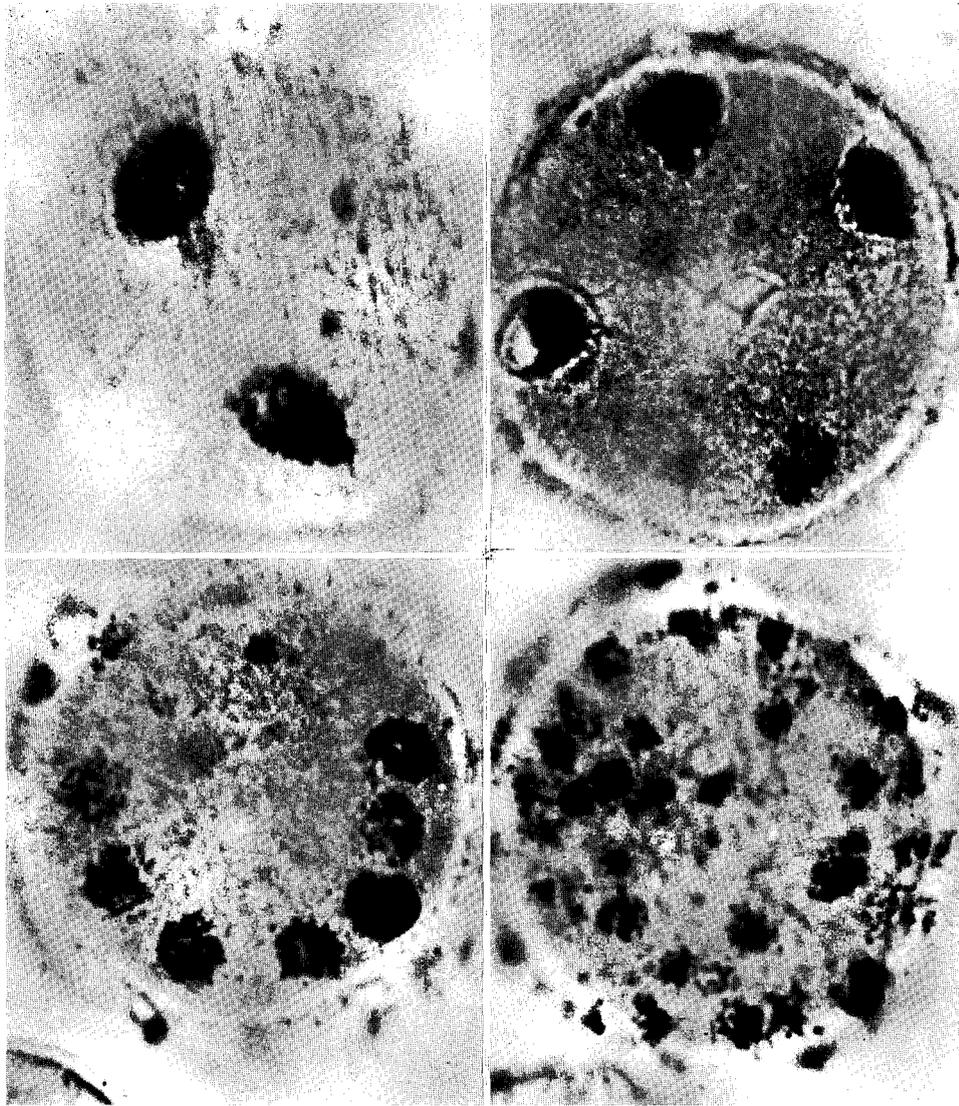


Planche 2.—Autoradiographies de coupes d'embryons d'*Arbacia* ♀ × *Arbacia* ♂ à différents stades du développement, marqués par la thymidine-³H.

DNA marqué dans le noyau des contrôles P ♀ × P ♂; mais ce report fait diminuer la quantité de DNA marqué dans les noyaux des hybrides P ♀ × A ♂ (Tableaux I, III et IV).

TABLEAU I.

Thymidine- ³ H (pulses d'1 h)	P♀ × P♂ —		P♀ × P♂ (PCA)		P♀ × P♂ (RNase)		P♀ × P♂ (DNase)		P♀ × A♂ —		P♀ × A♂ (PCA)		P♀ × A♂ (RNase)		P♀ × A♂ (DNase)		
	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	
st. 1, 2, 4 cell.	40	0	38	0	27	0	9	0	80	0	75	0	43	0	0	15	0
st. 8→64 cell.	16	0	14	0	0	0	0	0	40	0	35	0	4	0	12	0	0
Blast.	7	0	6	0	0	0	2	0	27	0	23	0	2	0	1	0	0
Gastr.	8	0	6	0	1	0	1	0	32	0	28	0	Blastulas bloquées→tém. = gastrulas 0→12 0		1	0	0

TABLEAU II.

Uridine- ³ H (pulses d'1 h)	P♀ × P♂ —		P♀ × P♂ (PCA)		P♀ × P♂ (RNase)		P♀ × P♂ (DNase)		P♀ × A♂ —		P♀ × A♂ (PCA)		P♀ × A♂ (RNase)		P♀ × A♂ (DNase)		
	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	
st. 1, 2, 4 cell.	st 2:0 st 4:4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
st. 8→64 cell.	21	6	17	4	7	0	4	4	9	0	9	5	2	0	1	1	1
Blast.	11	3	7	3	3	0	1	2	37	4	22	2	1	0	—	—	—
Gastr.	7	3	7	2	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	—	—	—

TABLEAU V.

Uridine- ³ H (pulses d'1 h)	P♀ × P♂ ^a —		P♀ × P♂ ^a (PCA)		P♀ × P♂ ^a (RNase)		P♀ × P♂ ^a (DNase)		P♀ × A♂ ^b —		P♀ × A♂ ^a (PCA)		P♀ × A♂ ^a (RNase)		P♀ × A♂ ^a (DNase)	
	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt
st. 1-2-4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
st. 8→64	5	0	6	1	2	0	3	2	9	5	12	6	5	0	3	3
Blast.	5	3	7	3	3	0	2	2	9	1	7	2	5	0	2	2
Gastr.	7	5	5	4	3	0	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—

TABLEAU VI.

Uridine- ³ H (chase)	P♀ × P♂ ^b —		P♀ × P♂ ^b (PCA)		P♀ × P♂ ^b (RNase)		P♀ × P♂ ^b (DNase)		P♂ × A♂ ^b —		P♀ × A♂ ^b (PCA)		P♀ × A♂ ^b (RNase)		P♀ × A♂ ^b (DNase)	
	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt
st. 2-4 reportés	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Morul. reportés	—	—	—	—	—	—	—	—	7	5	14	0	—	—	—	—
Blast. reportés	—	—	6	7	2	0	1	3	6	4	6	2	3	0	1	1
Gastr.	—	—	3	5	2	0	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—

TABLEAU VII.

	$A\text{♀} \times A\text{♂}^a$		$A\text{♀} \times A\text{♂}^a$ (PCA)		$A\text{♀} \times A\text{♂}^b$		$A\text{♀} \times A\text{♂}^b$ (PCA)		id. Uridine	$A\text{♀} \times A\text{♂}^a$		$A\text{♀} \times A\text{♂}^a$ (PCA)		$A\text{♀} \times A\text{♂}^b$		$A\text{♀} \times A\text{♂}^b$ (PCA)	
	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt		noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt	noy	cyt
Thymidine	noy	noy	noy	noy													
st. 2-4	45	47	40	42	st. 2-4	0	2	1	1	0	1	0	2				
Morul.	40	36	35	38	Morul.	3	3	4	2	3	4	4	3				
Blast.	12	10	13	10	Blast.	5	4	4	4	5	3	3	3				
Gastr.	11	10	11	9	Gastr.	—	—	—	—	—	—	—	—				

Les différences dans les intensités du marquage des témoins et des hybrides ne semblent pas dues à un différence de perméabilité consécutive au traitement (NaOH) préliminaire à l'hybridation.

^a Œufs non traités par NaOH.

^b Œufs traités par NaOH.

TABLEAU VIII.

Leucine- ³ H (continu)	$P\text{♀} \times P\text{♂}$	$A\text{♀} \times A\text{♂}$	$P\text{♀} \times A\text{♂}$
st. 2-4 cell.	37/blast.	65/blast.	42/blast.
Mor.: 64 cell.	12/cell.	15/cell.	15/cell.
Blast.	8/cell.	10/cell.	8/cell.
Gastr.	—	—	—

Le cytoplasme et le noyau sont marqués uniformément. Seuls, les œufs fécondés (témoins comme hybrides) sont marqués.

N.B. Oocytes marqués par la leucine-³H dans $P\text{♀} \times P\text{♂}$, $A\text{♀} \times A\text{♂}$ et $P\text{♀} \times A\text{♂}$. 6/nucléole, 15/suc nucléaire, 45/cytoplasme.

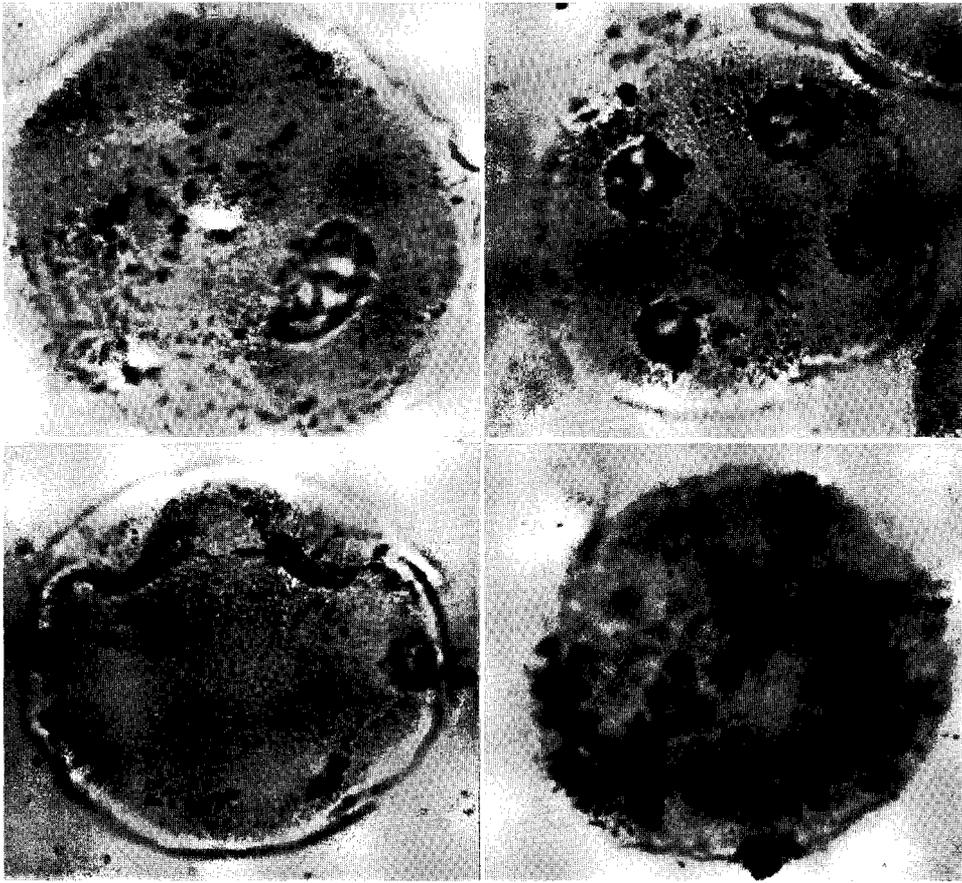


Planche 3.—Autoradiographies d'embryons hybrides *Paracentrotus* ♀ × *Arbacia* ♂ à différents stades du développement marqués par la thymidine-³H.

RNA. (Uridine, adénosine.) — Comme nous l'avions déjà observé auparavant [17], une fraction importante (environ 30 %) de l'uridine incorporée est utilisée à la synthèse du DNA; ce précurseur se comporte exactement comme la thymidine tant chez les hybrides que les contrôles.

Bien que les tests enzymatiques (RNase-DNase) appliqués aux préparations ne donnent pas toujours des résultats d'une netteté absolue, nous croyons pouvoir conclure que le RNA des embryons *normaux* commence à se marquer dès le stade 4 blastomères et que, pendant toute la segmentation, la radioactivité du RNA est presque exclusivement nucléaire. Une activité mesurable apparaît dans le cytoplasme au stade blastula. On observe des différences appréciables quand on compare les témoins aux hybrides : alors

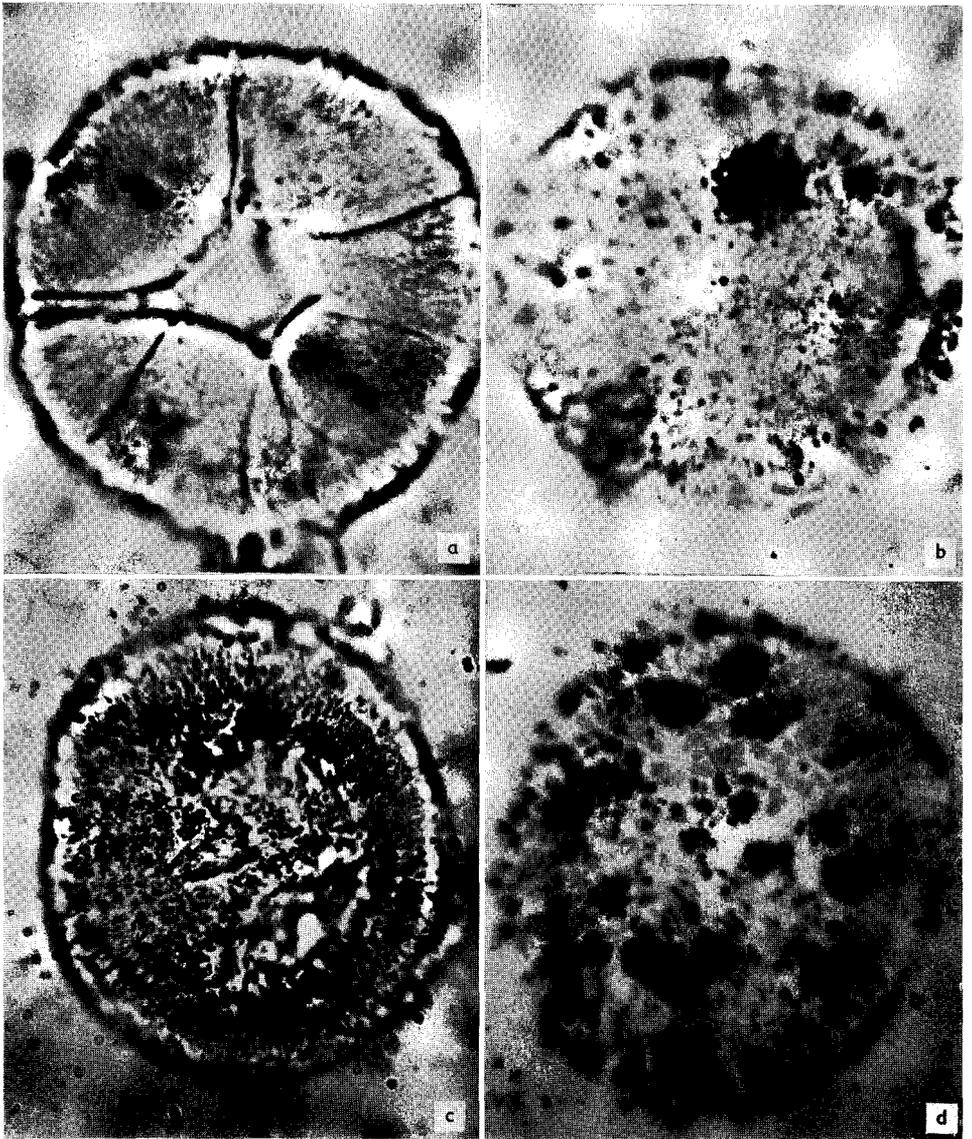


Planche 4.—Autoradiographies de coupes d'embryons témoins *Paracentrotus* ♀ × *Paracentrotus* ♂ et hybrides *Paracentrotus* ♀ × *Arbacia* ♂ marqués par l'adénosine-³H (a, b) et par l'uridine-³H (c, d).

que, comme nous venons de le voir, le cytoplasme des témoins commence à se marquer au stade blastula, chez les hybrides et, en particulier chez les stéréoblastulas bloquées, les *noyaux demeurent très marqués et le cyto-*

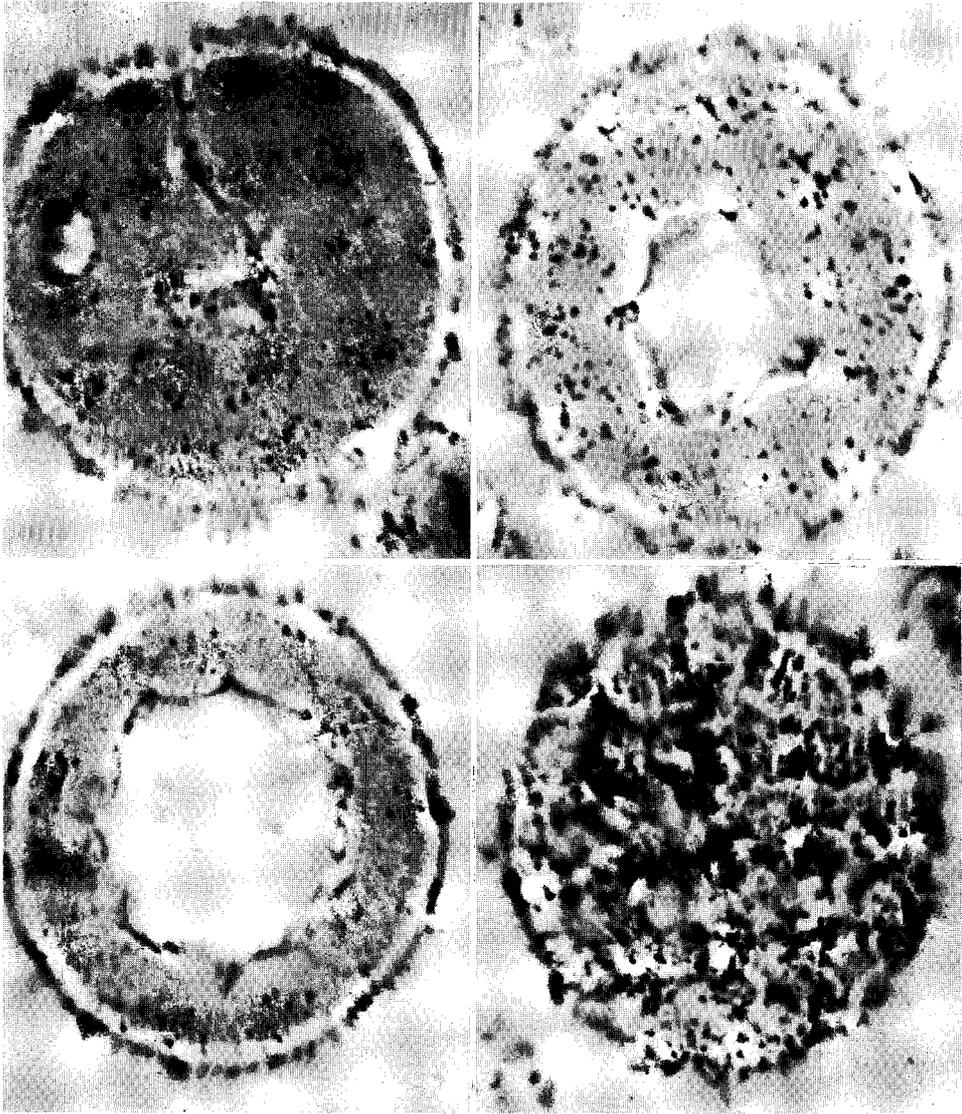


Planche 5.—Autoradiographies de coupes d'embryons témoins *Paracentrotus* ♀ × *Paracentrotus* ♂ marqués dans leurs protéines par la leucine-³H.

plasme ne l'est pratiquement pas (planche 4). On arrive à cette conclusion, que le marquage soit continu ou discontinu. Quand on tente de démarquer les embryons normaux (chase), le report en milieu « froid » fait diminuer légèrement l'intensité du marquage du RNA nucléaire au bénéfice du RNA

cytoplasmique. Dans les hybrides, par contre, le RNA paraît bloqué dans le noyau et le cytoplasme demeure pratiquement non marqué (Tableaux II, V et VI).

Les expériences effectuées en employant l'adénosine-³H comme précurseur conduisent exactement aux mêmes conclusions (Planche 4). En particulier, au stade 4, dans les embryons normaux ($P \text{♀} \times P \text{♂}$), seuls les chromosomes sont marqués par l'adénosine-³H (Planche 4, a). L'accumulation de RNA dans les noyaux des stéréoblastulas hybrides ($P \text{♀} \times A \text{♂}$) est peut-être encore plus évidente dans ces expériences que dans celles où le précurseur était l'uridine. Ajoutons que nous avons vérifié que les différences du taux d'incorporation entre les témoins et les hybrides ne sont pas dues à des différences de perméabilité consécutives au traitement par NaOH, selon Baltzer¹, que nous avons utilisé pour faciliter les fécondations interspécifiques : les témoins ($P \text{♀} \times P \text{♂}$ et $A \text{♀} \times A \text{♂}$), qu'ils soient traités ou non par NaOH, présentent les mêmes modalités d'incorporation pour la thymidine et l'uridine, aux différents stades. (Tableau VII).

Protéines. — Que le précurseur utilisé soit la phénylalanine-¹⁴C, la leucine-¹⁴C ou la leucine-³H, on n'observe pas de localisation préférentielle de la radioactivité dans le noyau ou dans le cytoplasme. Dans les contrôles, comme dans les hybrides, seuls les œufs fécondés (soit 10 % pour les hybrides) et les oocytes sont marqués. Les différences dans le marquage des protéines des témoins $P \text{♀} \times P \text{♂}$ et des hybrides $P \text{♀} \times A \text{♂}$ sont moins apparentes que pour les acides nucléiques. Les embryons $P \text{♀} \times P \text{♂}$ se comportent comme les embryons $A \text{♀} \times A \text{♂}$, sauf que ces derniers sont plus basophiles et plus radioactifs à tous les stades que les autres. D'une manière générale, le taux de l'incorporation des acides aminés dans les protéines augmente progressivement au cours du développement embryonnaire (Tableau VIII) (Planche 5).

DISCUSSION

Des expériences antérieures ont montré que, dans les embryons normaux, la synthèse du DNA, à en juger par l'incorporation de la thymidine-³H, débute très peu de temps après la fécondation et qu'elle précède la fusion des pronuclei [14, 15]. Nous avons pu démontrer l'existence d'un mécanisme de synthèse rapide du DNA pendant la segmentation chez l'oursin [17]. Comme chez les Amphibiens, l'uridine est un précurseur presque aussi

¹ Eau de mer à pH 9 par l'addition de 2,5 ml de NaOH N/10 pour 100 ml de suspension d'œufs. Après un prétraitement de 5 min, on ajoute le sperme. On lave après 10 min pour éliminer NaOH et l'excès de sperme.

efficace du DNA que la thymidine : l'œuf d'oursin, comme l'avait suggéré l'un de nous [8, 9] il y a une trentaine d'années, doit donc être capable de réduire le ribose en désoxyribose, pendant sa segmentation. A ce stade, un RNA à métabolisme actif est exclusivement localisé dans le noyau et nous avons fait l'hypothèse que ce RNA, lié au DNA, pourrait représenter un RNA messenger [17]. La synthèse du RNA et celle des protéines semblent être plus précoces chez l'oursin que chez les Batraciens, puisqu'elles débutent peu de temps après la fécondation. Nos résultats autoradiographiques confirment les données de Monroy, Vittorelli et Guarneri [24] obtenues en suivant l'incorporation de méthionine-³⁵S dans les protéines des œufs d'oursin par une méthode biochimique.

Les résultats de nos expériences sur les *hybrides* montrent que, quel que soit le précurseur étudié, l'intensité de l'incorporation chez l'hybride $P \text{♀} \times A \text{♂}$ est intermédiaire entre les types maternel $P \text{♀} \times P \text{♂}$ et paternel $A \text{♀} \times A \text{♂}$. Rappelons, à ce sujet, que Baltzer *et al.* [3] et Chen *et al.* [15] en dosant la teneur en DNA des embryons au cours du développement dans les espèces parentales et les hybrides ($P \text{♀} \times A \text{♂}$) ont également trouvé une valeur intermédiaire pour ces derniers. Néanmoins, pour ces auteurs, le taux de la synthèse du DNA serait plus élevé chez les embryons $P \text{♀} \times P \text{♂}$ que chez les embryons $A \text{♀} \times A \text{♂}$. L'apparente contradiction entre ces résultats biochimiques et les nôtres pourrait résulter de différences dans les quantités de réserves de précurseurs (pool) chez les deux espèces : en effet, l'intensité de l'incorporation de ces précurseurs (thymidine, uridine) dans le DNA, décelable par autoradiographie, dépend évidemment de facteurs tels que l'importance du « pool » préexistant de précurseurs, ainsi que de la perméabilité des œufs à ces derniers. En ce qui concerne la synthèse du DNA, nos résultats indiquent que cet acide nucléique serait anormalement instable chez les hybrides : contrairement à la règle, une partie du DNA marqué disparaît lorsque les embryons sont reportés dans un milieu « froid ». Ce phénomène pourrait s'expliquer, en partie, tout au moins, par une élimination de DNA marqué dans le cytoplasme : notons toutefois qu'une telle élimination, fréquente chez les hybrides létaux, n'a jamais été observée auparavant dans la combinaison étudiée [2]². Comme on l'a vu plus haut, nos propres observations ne nous ont pas permis non plus de déceler une élimination de matériel Feulgen positif dans le cytoplasme des hybrides létaux. Mais il ne faut pas oublier que la petite taille des cellules, chez l'oursin, rend aléatoires les résultats des études cytochimiques exécutées avec le seul microscope optique. Il est bien possible que l'autoradiographie permette de déceler des éliminations de chromatine que la réaction de Feulgen

ne révèle pas : n'oublions pas, en effet, que cette réaction implique une hydrolyse acide; si le DNA éliminé dans le cytoplasme était partiellement dégradé ou s'il se trouvait sous la forme d'une seule hélice, il échapperait à la détection par la réaction de Feulgen. C'est afin d'éclaircir ces points douteux qu'une étude des hybrides létaux au microscope électronique vient d'être entreprise dans notre laboratoire.

En ce qui concerne le RNA, nos résultats montrent que la migration du RNA nucléaire vers le cytoplasme tend à être ralentie, sinon complètement bloquée chez les hybrides. Cette accumulation du RNA dans les noyaux a la même conséquence pour les oursins que pour les Batraciens : le rejet vers la périphérie du DNA, qu'on retrouve sous la membrane nucléaire dans les deux cas.¹

En somme, l'analyse autoradiographique de la synthèse des acides nucléiques qui vient d'être présentée montre que les faits sont fondamentalement les mêmes pour les hybrides létaux entre oursins et entre Batraciens : apparition d'une mosaïque de noyaux inégalement riches en DNA et en RNA, rejet du DNA vers la périphérie, hyperproduction, dans de nombreux noyaux, d'un RNA nucléaire, qui est incapable de migrer vers le cytoplasme. La labilité anormale du DNA, dans nos expériences de report en milieu « froid », plaide en faveur d'une lésion profonde de cet acide nucléique chez les hybrides létaux.

Les résultats de nos expériences sont donc parfaitement compatibles avec les hypothèses que nous avons présentées [13] à propos des hybrides létaux entre Batraciens : les anomalies observées à propos de la labilité du DNA et de l'arrêt de la migration du RNA nucléaire, chez les hybrides létaux entre oursins, pourraient trouver leur explication si on imaginait qu'il se produit au hasard des molécules de DNA hybrides, provenant du noyau de l'œuf et de celui du spermatozoïde. On conçoit aisément que le DNA ainsi formé soit anormal et que les RNA messagers, s'ils se produisent encore, ne puissent plus quitter le « template » où ils ont pris naissance. Un modèle récent de Paigen [25] permettrait de le concevoir : cet auteur imagine, en effet, que le DNA ne serait transcrit que suivant l'une des hélices (« up » strand); l'autre (« down » strand) servirait à briser les liaisons hydrogène maintenant le RNA, en reformant les liaisons hydrogène initiales du DNA. On conçoit que ce rôle du « down » strand ne puisse plus être correctement rempli s'il se produit, dans l'hybride létaux, des appariements illégitimes entre hélices provenant d'espèces différentes.

¹ Nos résultats autoradiographiques sont en parfait accord, sur ce point, avec des données récentes de P. S. Chen et F. Baltzer (*Experientia* 18, 522 (1962)) montrant que le turnover du RNA est nettement réduit chez les hybrides (P ♀ × A ♂) par rapport aux témoins (P ♀ × P ♂) (Ajoute lors de la correction des épreuves).

D'autres possibilités, tout aussi plausibles, se présentent encore à l'esprit : par exemple, des RNA messagers pourraient être fixés et bloqués sur de simples hélices de DNA lors de la réduplication de celui-ci. On sait que Hall et Spiegelman [19] ont utilisé du DNA dénaturé pour « prendre au piège » le RNA dont la composition en base est complémentaire de celle de ce DNA; cette réaction permet, selon Bolton et Mc Carthy [6] d'immobiliser le RNA messenger au contact du DNA à simple hélice dans un gel d'agar. Peut-être un mécanisme de ce genre intervient-il pour empêcher le RNA de quitter les noyaux chez les hybrides létaux.

Il serait vain de vouloir pousser plus loin, à l'heure actuelle, la discussion : c'est l'utilisation des concepts et des méthodes de la Biologie moléculaire qui pourra seule expliquer les causes de la létalité chez les hybrides; tant que ces méthodes n'auront pas été employées, les faits fondamentaux nous resteront cachés.

RÉSUMÉ

Des expériences autoradiographiques ont été effectuées en vue de suivre les lésions métaboliques induites par l'hybridation, au niveau de la synthèse des acides nucléiques et des protéines.

Pour les différents précurseurs radioactifs utilisés (thymidine-³H, uridine-³H, leucine-³H, leucine-¹⁴C, phénylalanine-¹⁴C), l'hybride létaux P ♀ × A ♂ manifeste un type d'incorporation intermédiaire entre les types parentaux P ♀ × P ♂ et A ♀ × A ♂.

Dans les cas extrêmes, les noyaux des hybrides sont marqués de façon anarchique par la thymidine-³H. Une élimination de chromatine dans le cytoplasme n'est pas à exclure. Le DNA de ces noyaux s'accumule de façon anormale dans les embryons bloqués et est moins stable que le DNA des embryons témoins.

Une accumulation de RNA marqué est observé dans les noyaux des hybrides à un stade (blastula) où l'on observe chez les témoins une migration de RNA du noyau vers le cytoplasme.

Seuls les œufs fécondés (10 % chez les hybrides) sont marqués dans leurs protéines par les acides aminés radioactifs. On observe une inhibition de l'incorporation chez les hybrides P ♀ × A ♂ par rapport aux témoins A ♀ × A ♂.

SUMMARY

Autoradiographic experiments were undertaken to follow the metabolic abnormalities, due to hybridization, in the synthesis of nucleic acids and proteins.

For the different precursors used (^3H -thymidine, ^3H -uridine, ^3H -leucine, ^{14}C -leucine, ^{14}C -phenylalanine), the lethal hybrid $\text{P}\text{♀}\times\text{A}\text{♂}$ presents a pattern of incorporation intermediary between the parental types $\text{P}\text{♀}\times\text{P}\text{♂}$ and $\text{A}\text{♀}\times\text{A}\text{♂}$.

In the extreme cases, the nuclei of the hybrids are labelled in an anarchic way by ^3H -thymidine. An elimination of chromatin in the cytoplasm could explain these observations. The DNA of these nuclei accumulates in an abnormal manner in the blocked embryos and is less stable than the DNA of the control embryos.

An accumulation of labeled RNA is observed in the nuclei of the hybrids at a stage (blastula) when a migration of nuclear RNA towards the cytoplasm is observed in the controls.

Only, fertilized eggs (10 % in the case of the hybrids) are labelled in their proteins by the radioactive amino acids. There is slight inhibition of the incorporation in the hybrids $\text{P}\text{♀}\times\text{A}\text{♂}$ compared to the controls $\text{A}\text{♀}\times\text{A}\text{♂}$.

BIBLIOGRAPHIE

1. BALTZER, F. et BERNHARD, M., *Exptl. Cell Res. suppl.* **3**, 16 (1955).
2. BALTZER, F. et CHEN, P. S., *Rev. suisse Zool.* **67**, 183 (1960).
3. BALTZER, F., CHEN, P. S. et TARDENT, P., *Arch. Julius Klaus-Stift. Vererbungsforsch. Soz. Anthropol. Rassenhyg.* **36**, 126 (1961).
4. BALTZER, F., CHEN, P. S. et WHITELEY, A. H., *Exptl. Cell Res. Suppl.* **6**, 192 (1958).
5. BALTZER, F., HARDING, C., LEHMAN, H. E. et BOPP, P., *Rev. suisse Zool.* **61**, 402 (1954).
6. BOLTON, E. T. et MCCARTHY, B. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (N. Y.)* **48**, 1390 (1962).
7. BOSCO, M. et MONROY, A., *Experientia* **18**, 124 (1962).
8. BRACHET, J., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **108**, 813 (1931).
9. — *ibid.* **108**, 1167 (1931).
10. — *Ann. Soc. roy. Zool. Belg.* **75**, 49 (1944).
11. — *Arch. Biol.* **65**, 1 (1954).
12. — *J. cell. comp. Physiol.* **60**, suppl. 1, 1 (1962).
13. BRACHET, J., BIELIAVSKY, N. et TENCER, R., *Bull. Cl. Sci. Acad. roy. Belg.* **48**, 255 (1962).
14. CHEN, P. S. BALTZER, F., *Nature* **181**, 98 (1958).
15. CHEN, P. S., BALTZER, F. et ZELLER, C., *Symp. on Germ cells and Develop.* p. 506. Ist. intern. Embryol. et Fond. A. Baselli, 1960.
16. FICQ, A., *The Cell*, Vol. 1, ch. 3, p. 67. J. BRACHET et A. MIRSKY (ed.). Acad. Press, New York, 1959.
17. FICQ, A., AIELLO, F. et SCARANO, E., *Exptl. Cell Res.* **29**, 128 (1963).
18. GREGG, J. R. et LØVTRUP, S., *Exptl. Cell Res.* **19**, 621 (1960).
19. HALL, B. D. et SPIEGELMAN, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. N. Y.* **47**, 137 (1962).
20. HARDING, C. V., HARDING, D. et BAMBERGER, J. W., *Exptl. Cell Res. Suppl.* **3**, 181 (1955).
21. IMMERS, J., *Exptl. Cell Res.* **18**, 585 (1959).
22. — *ibid.* **24**, 356 (1961).
23. MARKMAN, B., *Exptl. Cell Res.* **23**, 118 (1961).
24. MONROY, A., VITTORELLI, M. L. et GUARNERI, R., *Acta embryol. morphol. exptl.* **4**, 77 (1961).
25. PAIGEN, K., *J. Theoret. Biol.* **3**, 268 (1962).
26. SCARANO, E. et MAGGIO, R., *Exptl. Cell Res.* **18**, 333 (1959).
27. SIMMEL, E. B. et KARNOFSKY, D. A., *J. Biophys. Biochem. Cytol* **10**, 59 (1961).
28. TENCER, R., *Nature* **190**, 100 (1961).
29. ZELLER, C., *Arch. Entwicklungsmech.* **148**, 311 (1956).

