

ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DU MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES ET DES PROTÉINES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DE L'ŒUF CHEZ *ARBACIA LIXULA* (1)

par

V. Nigon et S. Gillot.

Laboratoire de Zoologie Expérimentale, Faculté des Sciences de Lyon.

Résumé

1. On a étudié par voie autoradiographique l'incorporation de divers précurseurs durant la segmentation de l'œuf d'oursin, *Arbacia lixula*. Les précurseurs utilisés ont été ajoutés à l'eau de mer dans laquelle s'effectue le développement des œufs.

2. La thymidine tritiée s'incorpore essentiellement dans l'ADN nucléaire. L'uridine et la cytidine tritiées s'incorporent pour la plus grande part dans l'ADN nucléaire, pour une faible part dans l'ARN nucléaire et cytoplasmique.

3. Si l'on cherche la limite des concentrations de précurseurs additionnés à l'eau de mer, susceptible de donner lieu à un marquage visible dans les conditions employées, on constate que cette limite correspond à 2 $\mu\mu\text{c/ml}$ pour la thymidine. Pour obtenir les mêmes résultats, il faut employer des quantités d'uridine ou de cytidine tritiées dix fois plus élevées (20 $\mu\mu\text{c/ml}$).

4. L'addition de thymidine ou désoxyuridine non marquée en large excès déprime l'incorporation de l'uridine et de la cytidine tritiées. Cet effet paraît s'exercer autant sur l'incorporation dans l'ARN que sur la fixation dans l'ADN. De même l'addition d'uridine froide réduit l'incorporation de thymidine tritiée. Diverses hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat.

5. L'incorporation des acides aminés a été étudiée à l'aide de méthionine S^{35} , de glycine et de tyrosine tritiées. Durant les deux premières heures du développement, on constate un marquage uniforme dans l'œuf, comportant tout au plus un léger excès au niveau des figures achromatiques. Durant les heures suivantes, le marquage nucléaire devient beaucoup plus fort que le marquage cytoplasmique. Il semble donc exister une différence dans le métabolisme des protéines nucléaires entre les deux premières heures du développement et les heures qui suivent immédiatement. En particulier la synthèse de protéines liée à cette incorporation d'acides aminés ne se rattache sans doute que de façon indirecte à la multiplication chromosomique.

6. Des fragments d'ovaires mis en présence de cytidine et de thymidine tritiées, *in vitro*, montrent une incorporation constamment limitée aux noyaux, parfois même aux nucléoles. La thymidine s'incorpore dans l'ADN, la cytidine plutôt dans l'ARN. Le marquage par la thymidine se limite aux jeunes ovocytes. Le marquage par la cytidine s'étend de façon plus uniforme jusqu'aux ovocytes âgés.

Bien que les conditions très artificielles utilisées pour l'incubation nous contraignent à une certaine prudence dans l'interprétation, on peut supposer que la synthèse d'ADN se déroule surtout dans les jeunes ovocytes, tandis que le métabolisme de l'ARN est plus uniformément réparti au long de l'ovogenèse.

(1) Travail effectué avec l'aide du Commissariat à l'Energie Atomique (contrat 4296/r).

I. — INTRODUCTION.

L'œuf d'oursin subit dans les premières heures de son développement des transformations dont les aspects morphologiques sont généralement bien connus. De nombreuses études ont porté sur les modifications biochimiques corrélatives ; celles-ci sont, le plus souvent, analysées sur un plan purement chimique. Malgré les apports importants fournis par les travaux de certains auteurs, les rapports entre les structures cellulaires et leurs activités restent, sur ce matériel classique, encore imparfaitement définis. Appliquées à ce genre de problèmes, les méthodes autoradiographiques offrent des possibilités considérables. Grâce au pouvoir de résolution qu'autorise le tritium et à l'activité spécifique élevée qu'il peut donner aux précurseurs marqués, l'emploi de substances contenant cet isotope permet une localisation fine des molécules au sein de la cellule. Sans doute, l'utilisation de cette forme d'hydrogène n'est-elle pas sans présenter des inconvénients qui obligent à conserver une certaine prudence dans l'interprétation. On obtiendra, généralement, par ce moyen, un certain nombre d'indications qui devront être, ultérieurement, soumises à vérification par d'autres méthodes.

II. — DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.

Parmi les problèmes que posent les rapports entre la structure cellulaire et le métabolisme, trois catégories de questions, liées entre elles d'ailleurs, nous ont paru présenter un intérêt particulier. La synthèse rapide de l'ADN représente, sans aucun doute, l'un des aspects majeurs de la biochimie cellulaire au début du développement. La synthèse et le renouvellement de l'ARN importent également, au premier chef, par suite du rôle central que paraît jouer cette substance, considérée, à la fois, comme un intermédiaire dans la transmission de l'information génétique et comme un facteur de la synthèse protéique. Enfin, la formation de protéines nouvelles pose un certain nombre de problèmes quant à son déroulement dans le temps et à sa localisation dans les organites cellulaires.

I - La synthèse de l'ADN.

Plusieurs études récentes (Bucher et Mazia, 1960 ; Nigon et Nonnenmacher, 1960 ; Simmel et Karnofsky, 1961) montrent l'existence, dès le début du développement de l'œuf d'oursin, d'une incorporation de thymidine dans l'ADN nucléaire. Nigon et Nonnenmacher, en particulier, constatant qu'une variation importante dans la concentration du précurseur fourni ne conduit pas, au cours des premières divisions, à une modification notable du marquage nucléaire, en concluent que les précurseurs endogènes de l'ADN nucléaire ne peuvent être recherchés au niveau d'une réserve cytoplasmique, utilisée sous

forme macromoléculaire, sans dégradation préalable. Il était évident, dès l'abord, que la fourniture de précurseurs radioactifs en quantités décroissantes devrait conduire à un affaiblissement du marquage à partir d'un certain degré de dilution : la connaissance de cette limite est susceptible de fournir quelques éléments de départ à des recherches portant sur l'importance du pool des précurseurs endogènes de l'ADN. C'est la raison pour laquelle il importait de poursuivre cette expérience par l'emploi de solutions plus diluées. D'autre part, l'utilisation d'un précurseur unique pour l'étude de cette question conduit à une interprétation aléatoire, du fait des particularités qui peuvent être attachées à chacun des composants de l'ADN. C'est pourquoi il nous est apparu nécessaire d'étendre cette analyse à d'autres précurseurs : on s'est donc servi, outre de thymidine, d'uridine et de cytidine tritiées. De plus, il importait de savoir si l'étude de stades plus avancés de la segmentation pourrait révéler des différences qui n'apparaissent pas après des incubations de courtes durées sur des œufs au début de leur développement.

2 - Le renouvellement de l'ARN.

Plusieurs études ont prouvé que, durant les premières heures du développement de l'œuf d'oursin, interviennent des variations, faibles mais mesurables, de la quantité d'ARN (Elson, Gustafson et Chargaff, 1954 ; Olsson, 1961). Des études plus anciennes (Villem, Lowens, Gordon, Leonard et Rich, 1949) avaient montré déjà qu'une partie au moins de l'ARN de l'œuf est soumise à un certain renouvellement. Au niveau de quels sites cellulaires ce renouvellement se réalise-t-il ? Il y a lieu de noter en particulier qu'aucune structure nucléolaire n'est visible dans l'embryon d'oursin aux stades jeunes ; or, le nucléole passe pour être le lieu d'une synthèse active d'ARN. L'ARN serait-il, dans ce cas, de formation exclusivement cytoplasmique ? D'après Markman (1961), la synthèse d'ARN serait plus importante, par unité de volume, dans le noyau que dans le cytoplasme.

3 - La synthèse des protéines.

Diverses études ont porté sur la synthèse des protéines au cours du développement de l'œuf d'oursin. Les plus nombreuses ont montré que, dès le début du développement, une incorporation active d'acides aminés marqués se produit au sein du chondriome (Nakano et Monroy, 1958 ; Giudice et Monroy, 1958 ; Monroy et Nakano, 1959), dans les protéines solubles (Hultin, 1950), et dans les microsomes (Hultin, 1953). Certaines de ces incorporations paraissent en rapport avec les synthèses qui commandent le déroulement de la division cellulaire (Hultin, 1961). D'autres, comportant la fixation de méthionine S^{35} au niveau du chondriome, correspondent plutôt, semble-t-il, à la formation de glutathion qu'à une véritable synthèse protéique.

Certaines études indiquent l'existence d'une synthèse particulièrement active dans le cytoplasme ; les noyaux comporteraient une fixation moindre de leucine radioactive (Markman, 1961). D'après Immers (1959, 1961), l'emploi d'un mélange de 14 acides aminés

marqués par C^{14} permet d'obtenir des autoradiographies qui semblent indiquer un marquage uniforme dans l'ensemble du volume cellulaire. Immers note, cependant, l'existence de différences selon les espèces : ainsi, chez *Sphaerechinus granularis*, il constate que, dans de jeunes ovocytes, les acides aminés marquent particulièrement les noyaux, ce qui n'est observé chez aucune des autres espèces qu'il étudie. Monroy et Nakano (1959) observent également une fixation de méthionine sur les noyaux des ovocytes. Ainsi les observations effectuées jusqu'à présent sur les embryons d'Echinodermes ne révèlent aucune synthèse protéique à localisation nucléaire ; de telles localisations ne sont signalées que durant l'ovogenèse. Ces résultats se distinguent des constatations faites chez d'autres espèces, en particulier chez les batraciens et les oiseaux, où l'on note une importante fixation nucléaire des acides aminés radioactifs (Ficq, 1954 ; Sirlin et Waddington, 1954 ; Sirlin, 1955). Cette apparente contradiction nous a paru également mériter un nouvel examen.

III. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

L'ensemble des expériences, portant sur *Arbacia lixula*, a été réalisé à l'aide d'animaux recueillis le jour même. Les observations ont été faites en 1961 et 1962 entre les mois d'avril et de juillet, période au cours de laquelle les animaux ont fourni régulièrement des pontes abondantes dans un état physiologique très homogène (1).

1 - Modalités d'expériences.

La plupart des expériences effectuées peuvent se classer de la façon suivante :

a) Dans une série d'expériences, les embryons sont mis dans de l'eau de mer additionnée de précurseurs à diverses concentrations : on a cherché à déterminer ainsi les limites d'une incorporation décelable par une autoradiographie réalisée dans des conditions standard.

b) Une autre série d'expériences a mis les embryons en présence d'un précurseur donné à partir du moment de la fécondation et pour des durées différentes comprises entre une heure et six heures. On cherchait ainsi à mettre en évidence l'influence de la durée d'action du précurseur.

c) Dans une troisième série d'expériences, les embryons n'ont été mis en présence des précurseurs qu'après avoir accompli une partie de leur développement dans de l'eau de mer ordinaire. On cherchait ainsi à séparer l'influence de la durée, examinée dans l'expérience précédente, de l'influence propre exercée par le stade de développement atteint.

d) Dans une dernière série d'expériences, les embryons ont été mis en présence d'eau de mer contenant un mélange de précurseur

(1) Une partie importante de ce travail a été effectuée dans les Stations de Villefranche-sur-Mer et de Tamaris-sur-Mer. Nous remercions très vivement MM. P. Bougis et G. Pérès pour les facilités qu'ils nous y ont accordées.

radioactif et d'autres non marqués. On analysait ainsi l'action d'une concurrence éventuelle entre ces précurseurs.

e) Enfin dans certains cas, des fragments d'ovaires ont été incubés dans divers précurseurs afin de comparer les incorporations dans l'ovocyte non mûr et celles de l'œuf en cours de développement.

2 - Techniques de prélèvement et d'élevage.

Les ovaires d'*Arbacia lixula* présentent une structure en grappe d'acini. Pour étudier les incorporations dans les ovocytes, on s'est borné à prélever quelques acini qui ont été déposés durant un temps donné dans de l'eau de mer additionnée de précurseurs. Bien que ces conditions d'expérience ne soient pas très physiologiques, elles ne paraissent avoir déterminé aucune altération dans la morphologie des ovocytes. Il semble, en effet, que la composition saline du liquide coelomique soit, chez les oursins, analogue sinon identique à celle de l'eau de mer (Robertson, 1939 ; Cole, 1940).

Les produits génitaux ont été recueillis après leur émission par l'animal. Celle-ci a été provoquée par l'emploi d'un procédé simple, fortuitement découvert, et dont l'efficacité apparaît excellente lorsqu'on dispose d'animaux matures. Aussitôt ramenés au laboratoire, les oursins sont lavés, l'un après l'autre et durant quelques secondes, sous un jet d'eau douce, destiné primitivement à détruire les spermatozoïdes qui auraient pu souiller la surface extérieure des femelles. Puis, chaque animal est immédiatement rincé sous un jet d'eau de mer, fraîchement récoltée au large et transportée au laboratoire dans des bonnes plastiques. Ce traitement déclenche l'émission des produits génitaux. Les animaux sont alors posés par leur pôle aboral sur un tube de Borrel garni d'eau de mer et dans lequel sont recueillis les œufs ou le sperme fournis. Les pontes sont contrôlées individuellement afin de vérifier l'absence ou la rareté des ovocytes non mûrs et, éventuellement, d'éliminer les lots qui auraient pu être fécondés par une contamination de sperme. La suspension d'œufs est ensuite filtrée sur une étamine qui retient diverses impuretés (feces, etc.). Les œufs sont dégangés par addition d'acide acétique et agitation. Puis ils sont lavés par de l'eau de mer renouvelée grâce à trois ou quatre décantations successives.

Dans les expériences de courte durée, les ovocytes sont placés dans l'eau de mer additionnée de précurseurs ; ils y sont fécondés par l'adjonction de sperme dilué. Dans les expériences de durée plus longue, les ovocytes sont d'abord additionnés de sperme. Dix minutes après, on contrôle l'efficacité de la fécondation. Les œufs sont ensuite lavés deux fois, par décantation dans de l'eau de mer, pour éliminer la plus grande partie du sperme en excès. C'est après cela seulement, qu'ils sont mis en présence du précurseur.

Les incubations dans les solutions radioactives sont effectuées dans des godets de verre à fond arrondi dont le diamètre atteint environ 2 cm et la contenance 1,5 ml. Pour que le développement s'effectue de façon régulière, il est nécessaire que le fond du godet ne contienne pas plus d'une ou deux couches d'œufs régulièrement sédimentés. Les godets eux-mêmes sont placés dans des chambres

humides formées par des boîtes de Pétri dont le fond est couvert d'eau de mer. Dans ces conditions, on peut obtenir 80 à 90 p. 100 d'œufs normalement segmentés.

3 - Technique histologique et autoradiographique.

Après achèvement de l'expérience, la plus grande partie du liquide d'incubation est retirée et remplacée par le fixateur suivant :

eau	30 volumes
alcool	16 volumes
acide acétique	1 volume

Après une heure de fixation, on opère plusieurs lavages à l'eau distillée et on pratique une double inclusion gélose-paraffine. Les coupes, faites à 7 μ sont recouvertes d'une émulsion pelliculable Kodak AR-10. L'exposition dure deux semaines. Après développement, la coloration est effectuée au vert de méthyle-pyronine.

Avant émulsionnage, certaines préparations ont été traitées par des solutions de diastases spécifiques, désoxyribonucléase ou ribonucléase cristallisée (Worthington Bioch.). Ces diastases sont dissoutes dans une solution de sulfate de magnésium 4×10^{-2} M tamponnée à pH 7,5 par une solution mixte de phosphates de sodium et de potassium. Les enzymes sont utilisés à une concentration de 10 mg/100 cm³ de solution saline. Les traitements par les diastases sont effectués à 37°, durant 7 heures pour la désoxyribonucléase, pendant 3 heures pour la ribonucléase.

4 - Précurseurs employés.

Les précurseurs suivants ont été utilisés :

Thymidine tritiée - New England Nuclear Corp. Act. spéc. 1.900 mc/mM
- Schwarz Bioresearch - Act. spéc. 3.000 mc/mM.

Thymidine méthyl-tritiée (New England Nuclear Corp.)
Act. spéc. 6.590 mc/mM.

Uridine tritiée (New England Nuclear Corp.)
Act. spéc. 3.280 mc/mM. et 2.020 mc/mM.

Cytidine tritiée (New England Nuclear Corp.)
Act. spéc. 1.000 mc/mM et 1.840 mc/mM.

Thymine tritiée (New England Nuclear Corp.)
Act. spéc. 11.300 mc/mM.

Méthionine S³⁵ (Commissariat à l'Énergie Atomique)
Act. spéc. environ 15 mc/mM au moment de l'expérience.

Glycine tritiée (Radiochemical Center, Amersham)
Act. spéc. 176 mc/mM.

Tyrosine tritiée (Radiochemical Center, Amersham)
Act. spéc. 242 mc/mM.

Dans tous les cas, on a utilisé une solution contenant au départ 1 mc/ml. A l'aide de micropipettes à remplissage automatique, les quantités voulues de solutions radioactives sont prélevées et diluées dans un volume approprié d'eau de mer pour être immédiatement utilisées.

TABLEAU I. — LOCALISATION DES MARQUAGES
(Le temps 0 est compté à partir de l'instant de l'addition du sperme)

		INCUBATION ENTRE 0 ET 1 H				INCUBATION ENTRE 0 ET 5 H				INCUBATION ENTRE 4 ET 5 H			
		Cytidine	Uridine	Thymidine	Thymine	Cytidine	Uridine	Thymidine	Thymine	Cytidine	Uridine	Thymine	
Localisation topographique	Noyau	Marquages nets	Marquages très faibles	Marquages nets	Pas de marquage	Marquages massifs	Marquages massifs mais moins que pour la cytidine et la thymidine.	Marquages massifs		Marquage nucléaire égal ou supérieur à celui du cytoplasme.	Même distribution que de 0 à 5 heures, avec affaiblissement tant sur les noyaux que sur le cytoplasme.		
	Cytoplasme	Pas de marquage				Marquage élevé mais très inférieur à celui des noyaux.	Marquage élevé plus intense que pour la cytidine, très inférieur à celui des noyaux.	Marquage apparaissant pour des concentrations égales ou supérieures à 2 µc/ml.					
Localisation moléculaire	Noyau					La plus grande partie du marquage est dans l'ADN; une faible part se trouve dans l'ARN.		Incorporation dans l'ADN seulement.					
	Cytoplasme					La quasi totalité de l'incorporation est dans l'ARN.		Le marquage paraît insensible à l'action des agents capables de dissoudre l'ARN.					

La thymidine et la désoxyuridine non marquées proviennent de Mann Research Laboratories, l'uridine non marquée de Calbiochem.

IV. — LE MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS L'ŒUF EN COURS DE SEGMENTATION.

Les diverses conditions expérimentales mises en œuvre conduisent à des marquages qui diffèrent entre eux par leur intensité, par leur localisation dans les constituants morphologiques de l'œuf, par la nature chimique des substances marquées.

1 - Localisation et nature chimique des substances marquées.

Les photographies des planches I et II montrent bien la nature des résultats obtenus. Le tableau I résume les observations effectuées sur la localisation du marquage. On note que tous les précurseurs cités s'incorporent principalement dans l'ADN nucléaire. Des incorporations cytoplasmiques sont également observées : la plus grande partie d'entre elles disparaît après action de la ribonucléase. Cepen-

PLANCHE I

Figures 1, 2, 3, 4, 5 : Influence de l'activité spécifique de la thymidine sur l'intensité des marquages. *Thymidine tritiée Schwarz 3.000 mc/mM diluée par de la thymidine froide dans l'eau de mer.* Incubation 0-5 heures.

- 1 et 2. — Thymidine tritiée à 20 $\mu\text{c/ml}$ - 3.000 mc/mM.
3. — Thymidine tritiée + thymidine froide activité finale 20 $\mu\text{c/ml}$ - 200 mc/mM.
4. — Thymidine tritiée + thymidine froide activité finale 20 $\mu\text{c/ml}$ - 20 mc/mM.
5. — Thymidine tritiée + thymidine froide activité finale 20 $\mu\text{c/ml}$ - 2 mc/mM.

Figures 6, 7, 8 : Influence de la concentration de la thymidine tritiée sur l'intensité des marquages. Thymidine tritiée New England 1.900 mc/mM. Incubation 0-5 heures.

- 6 et 7. — 0,2 $\mu\text{c/ml}$.
8. — 0,02 $\mu\text{c/ml}$.

Figures 9, 10, 11 : Influence de la concentration de l'uridine tritiée sur l'intensité et la répartition des marquages. Uridine tritiée New England. 3.180 mc/mM. Incubation 0-5 heures.

9. — 40 $\mu\text{c/ml}$.
10. — 2 $\mu\text{c/ml}$.
11. — 0,2 $\mu\text{c/ml}$.

PLANCHE II

Figures 1, 2, 3, 4, 5, 6 : Incorporation de cytidine tritiée (New England 1.000 mc/mM).

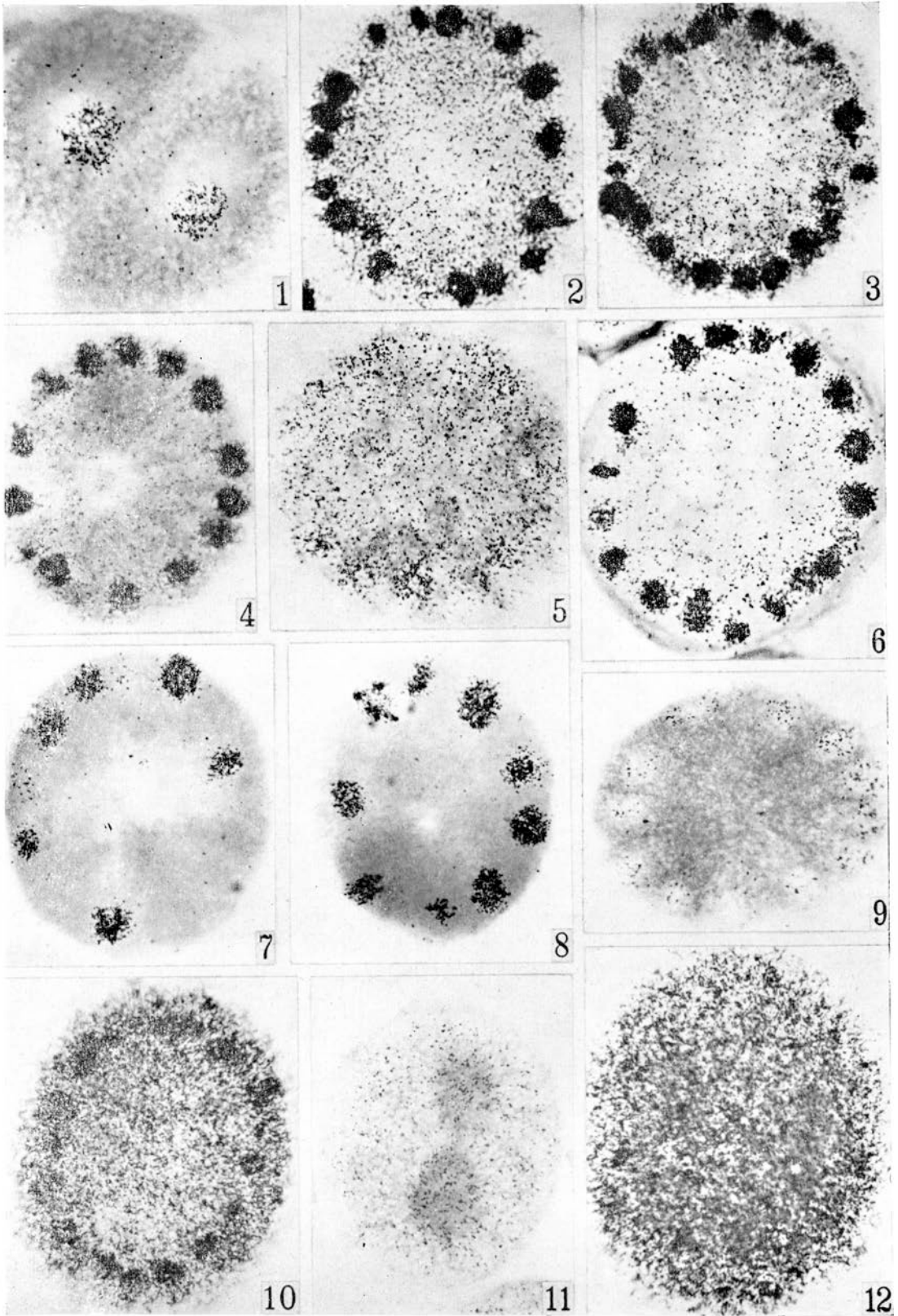
1. — 40 $\mu\text{c/ml}$ - Incubation 0-1 heure.
- 2 et 3. — 40 $\mu\text{c/ml}$ - Incubation 0-5 heures.
4. — 20 $\mu\text{c/ml}$ - Incubation 0-5 heures.
5. — 40 $\mu\text{c/ml}$ - Préparation soumise à l'action de la désoxyribonucléase.
6. — 40 $\mu\text{c/ml}$ - Préparation soumise à l'action de la ribonucléase.

Figures 7, 8, 9 : Compétition entre précurseurs des acides nucléiques.

- 7 et 8. — Thymidine tritiée : 20 $\mu\text{c/ml}$ + uridine froide.
9. — Cytidine tritiée : 2 $\mu\text{c/ml}$ + thymidine froide.

Figures 10, 11, 12 : Incorporation des acides aminés.

10. — Tyrosine tritiée - Incubation 0-5 heures.
11. — Tyrosine tritiée - Incubation 0-1 heure.
12. — Méthionine S³⁵ - Incubation 0-5 heures.



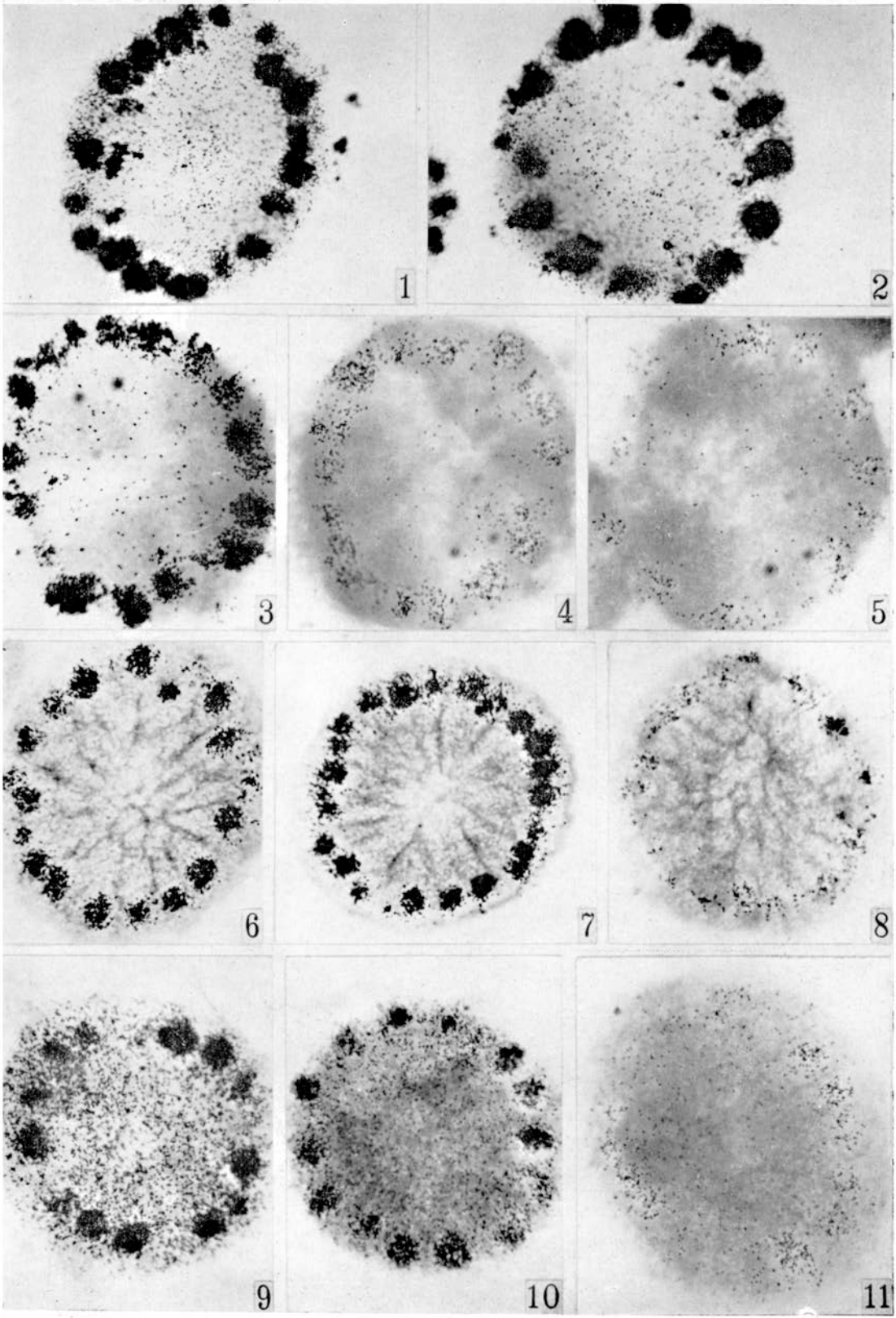


TABLEAU II. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DES DIVERS PRÉCURSEURS
EMPLOYÉS SUR L'INTENSITÉ DES MARQUAGES

(Les marquages sont observés chez des embryons incubés durant cinq heures dans la solution radioactive.)

Activité par millilitre	Localisation topographique du marquage	Cytidine 1 et 1,8 c/mM	Uridine 2 et 3 c/mM	Thymidine 2 à 6 c/mM
40 $\mu\text{c/ml}$	noyaux	Tous les marquages sont massifs	Marquages massifs (moins que pour la cytidine de même activité)	
	Cytoplasme	Marquage élevé	Marquages très élevés (plus que pour la cytidine)	
20 $\mu\text{c/ml}$	noyaux	Marquages massifs en général	Marquages massifs en général.	Tous les marquages sont massifs
	Cytoplasme	Marquage moyen	Marquage élevé	Marquage faible (cf. cytidine 2 μc)
2 $\mu\text{c/ml}$	noyaux	Marquages massifs peu nombreux	Marquages élevés	La plupart des marquages sont massifs
	Cytoplasme	Marquage faible	Marquage moyen	Marquage très faible
0,2 $\mu\text{c/ml}$	noyaux	Jamais de marquages massifs	Jamais de marquages massifs	Les marquages sont forts ; certains sont massifs
	Cytoplasme	Marquage très faible	Marquage faible	Pas de marquage
0,02 $\mu\text{c/ml}$	noyaux	Marquages rarement significatifs	Marquages rarement significatifs	Pas de marquages massifs. Intensité généralement intermédiaire entre celles de cytidine 0,2 $\mu\text{c/ml}$ et uridine 0,2 $\mu\text{c/ml}$
	Cytoplasme	Marquage quasiment nul	Marquage quasiment nul	Pas de marquage
0,002 $\mu\text{c/ml}$	noyaux	Pas de marquage	Pas de marquage	Rares marquages significatifs (cf. cytidine et uridine (0,02 $\mu\text{c/ml}$))
	Cytoplasme	Pas de marquage	Pas de marquage	Pas de marquage

dant, dans le cas de la thymidine, les incorporations cytoplasmiques n'apparaissent que pour des concentrations externes assez élevées et restent nettement plus faibles que celles qui peuvent être observées avec les autres précurseurs ; leur insensibilité vis-à-vis des éléments capables de dissoudre l'ARN conduit à penser que cette incorporation ne s'effectue pas dans les acides nucléiques. Cette incorporation cytoplasmique de la thymidine n'a pas été constatée dans les études de Nigon et Nonnenmacher qui portaient principalement sur des incubations de zéro à une heure. On peut supposer qu'elle résulte d'une métabolisation de la thymidine soit directement au sein de l'embryon, soit par d'autres organismes (bactéries par exemple), présents dans l'eau de mer où se fait l'incubation.

2 - Influence de la concentration des précurseurs employés.

Les observations de Nigon et Nonnenmacher montraient que la fourniture de thymidine en quantités décroissantes ne produit pas de variations appréciables dans l'intensité des marquages nucléaires lorsque la concentration apportée décroît de 40 à 2 $\mu\text{c/ml}$. Or, ces études portaient sur des incubations brèves, la plupart des embryons ayant été fixés au stade 2. Ces expériences ont été répétées pour des incubations de 5 heures. On constate alors que l'incubation dans la thymidine à 20 $\mu\text{c/ml}$ conduit à des marquages nucléaires uniformément massifs. Pour 2 $\mu\text{c/ml}$, on note à côté des noyaux à marquage massif, la présence d'une proportion appréciable de noyaux au niveau desquels le marquage, tout en restant élevé, est cependant nettement moins dense. Lorsque la concentration de thymidine exogène décroît encore, les marquages massifs disparaissent totalement, tandis que l'intensité moyenne du marquage diminue progressivement. Pour 0,002 $\mu\text{c/ml}$,

TABLEAU III. — INFLUENCE DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE ET DE LA CONCENTRATION DE LA SOLUTION DE THYMININE SUR L'INTENSITÉ DES MARQUAGES NUCLÉAIRES.

Les marquages sont observés chez des embryons incubés durant cinq heures dans la solution radioactive.	
L'échelle suivante a été établie :	
Niveau 1 = Rares marquages significatifs ..	(Thymidine N.E. 1900 mc/mM - 0,002 $\mu\text{c/ml}$)
Niveau 2 = Marquages nets sans être massifs	(Thymidine N.E. 1900 mc/mM - 0,02 $\mu\text{c/ml}$)
Niveau 3 = Marquages forts, certains sont massifs	(Thymidine N.E. 1900 mc/mM - 0,2 $\mu\text{c/ml}$)
Niveau 4 = Tous les marquages sont massifs .	(Thymidine N.E. 6580 mc/mM - 20 $\mu\text{c/ml}$)
Les résultats suivants sont obtenus avec de la thymidine Schwarz étendue à l'aide de thymidine froide :	
— Thymidine Schwarz pure,	3.000 mc/mM - 20 $\mu\text{c/ml}$ - niveau 4
— Thymidine réduite à	200 mc/mM - 20 $\mu\text{c/ml}$ - entre 3 et 4
— Thymidine réduite à	20 mc/mM - 20 $\mu\text{c/ml}$ - entre 2 et 3
— Thymidine réduite à	2 mc/mM - 20 $\mu\text{c/ml}$ - environ 1

TABLEAU IV. — INFLUENCE D'UN PRÉCURSEUR NON RADIOACTIF
SUR L'INCORPORATION D'UN AUTRE PRÉCURSEUR RADIOACTIF

(L'activité des solutions servant à l'incubation est de 20 $\mu\text{c/ml}$ ou 2 $\mu\text{c/ml}$. Les embryons séjournent dans les solutions pendant cinq heures.)

			PRÉCURSEUR RADIOACTIF SEUL	PRÉCURSEUR RADIOACTIF + THYMIDINE FROIDE (environ 4×10^{-3} $\mu\text{M/ml}$)	PRÉCURSEUR RADIOACTIF + DÉSOXYURIDINE FROIDE (environ 4×10^{-3} $\mu\text{M/ml}$)	PRÉCURSEUR RADIOACTIF + URIDINE FROIDE (environ 4×10^{-3} $\mu\text{M/ml}$)
CYTIDINE TRITIÉE 1.800 mc/ mM	10^{-2} $\mu\text{M/ml}$	Noyaux	Marquages massifs en général	Marquages massifs rares	Mêmes résultats qu'avec l'addition de thymidine froide	
		Cytoplasme	Marquage moyen	Marquage faible		
	10^{-3} $\mu\text{M/ml}$	Noyaux	Marquages massifs peu nombreux	Marquages peu élevés, parfois à la limite de la détection		
		Cytoplasme	Marquage faible	Marquage nul ou très faible		
URIDINE TRITIÉE 2.000 mc/ mM	10^{-2} $\mu\text{M/ml}$	Noyaux	Marquages massifs en général	Certains marquages sont élevés sans être massifs ; nombreux marquages faibles		
		Cytoplasme	Marquage élevé	De faiblement à intensément marqué		
	10^{-3} $\mu\text{M/ml}$	Noyaux	Marquages élevés	Marquages plus ou moins nets, souvent à peine discernables		
		Cytoplasme	Marquage moyen	Marquage très faible		
THYMI-DINE TRITIÉE 6.580 mc/ mM	10^{-3} $\mu\text{M/ml}$	Noyaux	Marquages très massifs		Marquages élevés mais non massifs Marquage à peu près nul	
		Cytoplasme	Marquage faible			

les marquages nucléaires deviennent quasiment nuls (Tableau II, planche I, fig. 6 à 11).

Des observations analogues peuvent être faites sur l'incorporation de l'uridine et de la cytidine (tableau II) ; mais on constate que la diminution dans l'intensité des marquages nucléaires est plus rapide que pour la thymidine. Sans doute la comparaison entre les divers précurseurs n'est-elle pas entièrement exacte du fait que l'activité spécifique est différente pour chacun d'eux. Si l'on réduit l'activité spécifique de la thymidine par addition de thymidine froide, on constate, en effet, que le marquage peut devenir négligeable même pour 20 $\mu\text{c}/\text{ml}$ (Tableau III, Planche I, fig. 1 à 5) ; mais de tels effets ne sont observés que pour des variations très fortes dans l'activité spécifique des précurseurs. Ces variations restant relativement faibles d'un précurseur à l'autre, il paraît peu vraisemblable que les différences dans l'intensité du marquage tirent leur origine de ce facteur.

3 - Influence des compétitions entre précurseurs sur l'intensité des marquages.

Les solutions d'incubation ont été réalisées en ajoutant à l'eau de mer 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'un précurseur non radioactif (thymidine, uridine ou désoxyuridine) et, selon les cas, 2 ou 20 $\mu\text{c}/\text{ml}$ d'un précurseur tritié (thymidine, cytidine ou uridine). Les œufs ont été incubés durant cinq heures avant d'être fixés. Les résultats sont exprimés dans le tableau IV et la planche I (fig. 7 à 9).

On constate que, d'une façon générale, l'addition d'un précurseur non radioactif en concentration relativement élevée déprime le marquage par un précurseur radioactif quel qu'il soit. Ainsi la thymidine ou la désoxyuridine froide réduit l'incorporation de l'uridine ou de la cytidine tant dans l'ARN que dans l'ADN. De même, l'uridine froide diminue la fixation de la thymidine.

4 - Discussion et conclusion.

Il faut noter tout d'abord que nos résultats s'accordent avec les conclusions des auteurs pour montrer que, durant la segmentation de l'œuf d'oursin, le métabolisme de l'ADN est beaucoup plus actif que celui de l'ARN. La différence apparaît particulièrement frappante si l'on considère l'incorporation de l'uridine. Celle-ci peut s'effectuer dans l'ARN de façon très simple. En revanche, son incorporation dans l'ADN exige des remaniements, méthylation de l'uracile en thymine, transformation du ribose en désoxyribose, ce qui devrait, semble-t-il, entraîner des pertes. Malgré cela, ce précurseur marque l'ADN beaucoup plus fortement que l'ARN.

Cette incorporation des ribonucléosides pyrimidiques dans l'ADN paraît un fait d'observation générale que, depuis Hammarsten et coll. (1950), de nombreux travaux ont contribué à mettre en évidence. On peut donc admettre, en première analyse, que les enchaînements métaboliques obéissent ici à des règles banales. Ainsi, en se fondant sur les interprétations les plus généralement admises (voir Prusoff,

1958 ; Davidson, 1961 ; Reichard, 1961), on peut établir le diagramme de la fig. A où l'on a tracé les principales relations constatées entre les nucléosides pyrimidiques. Il est clair que ce diagramme apporte seulement une vue schématique, et l'on conçoit aisément la complexité des interactions que doit comporter l'ensemble de ce métabolisme dont les diverses parties réalisent un système homéostatique et qu'un schéma vient fausser à force de simplifications. C'est néanmoins à travers ce schéma que nous pouvons tenter d'apporter une explication à l'ensemble des faits que nous avons observés.

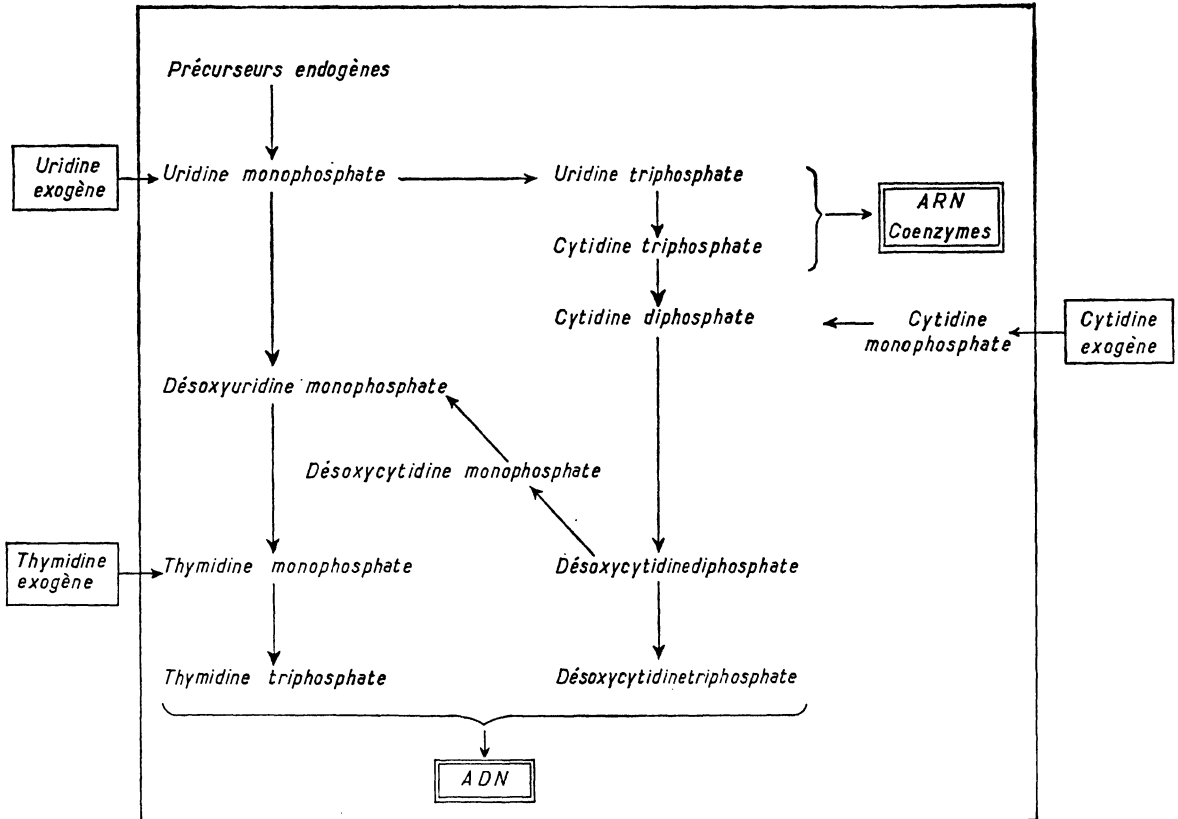


FIG. A : Les enchaînements métaboliques dans la synthèse des acides nucléiques. Combiné d'après Davidson (1961), Reichard (1959, 1961).

a) La plus grande efficacité de la thymidine dans la production des marquages peut y trouver des explications assez satisfaisantes. Divers travaux ont prouvé que la thymidine et la désoxycytidine constituent des précurseurs exclusifs de l'ADN (Reichard et Estborn, 1951 ; Friedkin et coll., 1956). Ainsi, dans cette partie du cycle, les conditions cellulaires et la nature des enzymes présents favorisent la transformation rapide de thymidine en ADN, excluant pratiquement la production de la réaction inverse. Le sort de l'uridine et de la cytidine est, au contraire, beaucoup plus varié. Ces précurseurs s'engagent dans les échanges les plus divers, les conditions de réaction permettant

vraisemblablement à des transformations réversibles de se produire aisément. Il en résulte que l'uridine et la cytidine se diluent dans un pool de métabolites beaucoup plus vaste que celui dans lequel s'intègre la thymidine. C'est peut-être à cette différence qu'il faut attribuer l'efficacité de la thymidine, dont l'incorporation est visible dans l'ADN à des concentrations dix fois plus faibles que celles qu'exige la cytidine ou l'uridine. Dans cette diversité des voies métaboliques ouvertes à l'uridine et à la cytidine, la formation d'ARN joue peut-être un certain rôle. L'ARN formé est réparti dans l'ensemble du volume de l'œuf, tandis que l'ADN est concentré au niveau des noyaux : des synthèses quantitativement équivalentes d'ARN et d'ADN se traduisent alors par des marquages d'intensité plus faible, dans le cas de l'ARN. De plus, il paraît vraisemblable qu'une partie des ribonucléosides pyrimidiques se trouve entraînée vers la synthèse de molécules qui disparaissent au cours des traitements histologiques, et ne sont donc pas révélées par l'autoradiographie.

b) L'action inhibitrice de l'uridine sur l'incorporation de thymidine s'explique aisément si l'on admet, d'après les résultats courants des auteurs, que l'uridine constitue un précurseur actif de la thymidine contenue dans l'ADN. En revanche, l'action comparable de la thymidine ou de la désoxyuridine sur l'incorporation de l'uridine et de la cytidine est beaucoup plus curieuse. Elle s'oppose en particulier à des observations faites sur d'autres matériels (Maley et Maley, 1960). Comme les conclusions des auteurs semblent solidement établies et que nos propres observations ont été répétées à plusieurs reprises, il faut bien admettre qu'il existe là une différence, dans les conditions ou dans le matériel, dont il est encore difficile de cerner les contours. On notera que cette action des désoxyribosides se manifeste au niveau du pool des précurseurs communs à l'ARN et l'ADN, puisque les deux sortes de marquages sont simultanément inhibés. Pour expliquer ces faits, trois catégories d'explications peuvent être envisagées. Ou bien la thymidine exogène, lorsqu'elle est présente en large excès, est capable de suppléer dans leurs fonctions habituelles, l'uridine et la cytidine. Ou bien la présence de la thymidine exogène limite la pénétration dans l'œuf, de l'uridine et de la cytidine exogènes. On pourrait enfin se demander si l'addition de nucléosides en excès ne vient pas simplement inhiber la synthèse d'ADN comme l'ont montré les observations faites par divers auteurs sur d'autres matériels : il semble que cette dernière hypothèse puisse être exclue d'emblée car, dans les conditions de nos expériences, la vitesse de segmentation ne paraît pas modifiée par rapport à celle des témoins, contrairement à ce qui a pu être observé parfois (Xeros, 1962).

La première hypothèse revient à admettre que, les conditions d'équilibre habituelles étant renversées par l'excès de thymidine, des dérivés uridiliques et cytidiliques sont susceptibles de se former à partir de la thymidine exogène. Cette hypothèse va à l'encontre des données actuelles ; elle ne paraît pas, cependant, pouvoir être écartée a priori, pour deux raisons. D'une part, l'emploi de la thymidine tritiée entraîne, semble-t-il, la localisation d'une part élevée sinon de la totalité du marquage au niveau du groupement méthylé. Or, dans les transformations que nous sommes conduits à supposer, ce groupement disparaîtrait et, avec lui, le marquage caractéristique. De

telles transformations ne seraient visibles que par l'emploi d'autres marqueurs (C^{14} par exemple), dont la faible activité spécifique rend la détection autoradiographique bien difficile. D'autre part, il semble que cette évolution ne deviendrait importante que pour des concentrations de thymidine nettement plus élevées que les concentrations de cytidine employées, ce qui implique un rendement assez faible de cette voie métabolique. Sa mise en évidence exigerait donc l'emploi d'activités élevées.

On notera que, lorsque la concentration de thymidine exogène s'élève fortement, des incorporations non nucléiques apparaissent, qui traduisent sans doute des remaniements importants du précurseur. D'autre part, l'incorporation de thymidine dans l'ARN a déjà été constatée. Brachet (1958) l'a décrite chez *Acetabularia*, organisme dont le métabolisme de l'ADN semble particulièrement faible. Berech et Van Wagtendonk (1962) montrent que, chez *Paramecium aurelia* le marquage provenant de la thymidine se retrouve dans l'uracile de l'ARN. Des résultats analogues ont été obtenus par Fink et Fink (1961, 1962) chez *Neurospora*. Enfin, Sells (1960) observe que, en présence de 6-azauracile, l'addition de thymidine déprime l'incorporation d'uracile chez *Bacillus cereus*. Quant aux observations de Nigon et Nonnenmacher (1961) au sujet de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ARN de l'ovaire chez la Drosophile et qui pourraient être interprétées dans le même sens, elles doivent être considérées avec prudence, car leur explication soulève encore de nombreuses difficultés (Nigon et Gillot, 1962). Il n'est peut-être pas sans intérêt de rapprocher ces observations de celles effectuées par Reichard, Canelakis et Canelakis (1960) montrant que l'incorporation de cytidine monophosphate dans l'ADN est fortement inhibée, *in vitro*, par l'addition de désoxyribonucléosides triphosphates.

La seconde hypothèse peut être conçue de diverses façons. Ou bien l'excès de thymidine exogène provoque un excès des dérivés uridiliques et cytidiliques endogènes — par une sorte de sous-consommation de ceux-ci — d'où la nécessité d'augmenter leur concentration dans le milieu extérieur si l'on veut voir la cytidine et l'uridine exogènes pénétrer dans l'œuf. Ou bien l'inhibition peut s'effectuer au niveau des mécanismes de transfert ; dans la mesure où des récepteurs communs existeraient pour le transfert de ces divers nucléosides, il se pourrait que la présence de l'un d'entre eux en excès inhibe la pénétration des autres. Des observations analogues, faites sur des cultures de tissus, ont conduit Feinendegen et coll. (1961) à un même champ d'hypothèses entre lesquelles toute décision reste délicate.

En conclusion, l'ensemble des observations effectuées permet de considérer que, dans le développement de l'œuf d'oursin, l'interconversion des dérivés pyrimidiques s'effectue selon des règles analogues à celles qui ont été observées dans d'autres organismes. Les équilibres sont agencés de telle manière que la thymidine est fixée très rapidement et avec un rendement élevé dans l'ADN, tandis que la cytidine et l'uridine se répartissent dans un réseau complexe d'activités métaboliques. La possibilité d'une compétition entre la thymidine et les ribonucléosides pyrimidiques ouvre le champ à un certain nombre d'hypothèses : seul l'emploi de méthodes proprement chimiques permettrait d'effectuer un choix entre ces diverses interprétations.

V. — L'INCORPORATION DES ACIDES AMINÉS AU COURS DU DÉVELOPPEMENT

L'emploi de précurseurs des acides nucléiques ne paraît pas révéler l'intervention de changements notables dans le métabolisme de l'embryon au cours des six premières heures du développement. En revanche, lorsqu'on utilise des acides aminés marqués, on constate que les incorporations obéissent, dans les deux heures qui suivent la fécondation, à des règles différentes de celles qui sont suivies durant les heures suivantes. Pour la tyrosine et la glycine tritiées, on a employé une concentration de 25 $\mu\text{c/ml}$; pour la méthionine S^{35} , on a utilisé 0,01 $\mu\text{c/ml}$ et 2 $\mu\text{c/ml}$.

1 - L'incorporation durant les deux premières heures du développement.

Les œufs incubés pendant 60 à 90 minutes sont, pour la plupart, marqués très nettement, quel que soit l'acide aminé utilisé.

— Pour la tyrosine et la glycine, on observe sur le cytoplasme et les noyaux au repos un marquage qui semble uniforme. Toutefois, les figures astériennes et les fuseaux achromatiques paraissent plus marqués que le reste de la cellule, d'une façon très nette avec la tyrosine, moins évidente avec la glycine (Planche II, fig. 11).

— Dans le cas de la méthionine, on obtient des marquages diffus. L'absence de localisation préférentielle peut être due ici à la nature du rayonnement émis par le S^{35} .

2 - L'incorporation jusqu'à la sixième heure de développement.

Les œufs développés pendant six heures, qu'ils aient été mis en présence de précurseurs radioactifs durant la totalité des six heures, ou seulement pendant les dernières 90 minutes, montrent toujours des noyaux beaucoup plus marqués que ne l'est le cytoplasme.

— Les œufs développés six heures dans la tyrosine ou la glycine ont des marquages cytoplasmiques intenses dominés par des marquages nucléaires plus élevés encore et souvent massifs (Planche II, fig. 10). Dans le cas de la méthionine, la différence entre marquages nucléaires et cytoplasmique est beaucoup moins évidente (Planche II, fig. 12).

— Les œufs qui, après 4 h 30 de développement dans l'eau de mer, sont mis durant 1 h à 1 h 30 en présence du précurseur, ont des marquages du même type mais atténués.

— La ribonucléase, essayée dans le cas de la glycine, ne réduit pas le marquage. Ainsi, il semble vraisemblable que les marquages obtenus à partir des acides aminés, révèlent l'importance de la synthèse protéique qui se déroule au moment de l'incubation. Dès le début du développement, on constate donc une synthèse protéique répandue dans l'ensemble du cytoplasme. La formation des figures

achromatiques comporte une incorporation qui, tout en étant un peu plus élevée, n'est cependant pas massive. Cette observation s'accorde avec les conclusions des travaux de Hultin (1961), montrant que la formation du fuseau est associée à une certaine synthèse protéique. Celle-ci n'est sans doute pas très importante car, d'après Mazia (1961), les constituants de la figure achromatique sont, pour la plus grande part, prélevés dans le cytoplasme sous une forme macromoléculaire, synthétisée avant la mitose. En particulier, la concentration plus élevée des groupes sulfhydrilés au niveau des fuseaux et des asters, notée par Kawamura et Dan (1958) et par Feneaux (1961), ne paraît pas répondre à une synthèse nette, car nous n'avons constaté, dans ces figures, aucune incorporation spéciale de la méthionine marquée.

On peut émettre diverses hypothèses pour expliquer la différence entre les marquages nucléaires faibles observés au début du développement et l'intensité des marquages obtenus six heures après. On pourrait supposer d'abord que les incorporations tardives seraient dues à un déroulement lent des processus qui conduisent à la synthèse des protéines nucléaires à partir des précurseurs employés. Le marquage nucléaire ne s'affirmerait alors qu'après une certaine latence mais cette explication vient buter contre le fait qu'une incubation d'une heure, si elle est effectuée après cinq heures de développement, suffit à fournir des marquages nucléaires supérieurs aux marquages cytoplasmiques. Il faut donc admettre que la synthèse des protéines nucléaires s'effectue durant la première heure du développement, selon des lois différentes de celles qui régissent cette synthèse ultérieurement. Ainsi l'incorporation des acides aminés révèle, semble-t-il, l'existence d'une modification dans le métabolisme cellulaire survenant au cours des premières heures du développement.

VI. — LE MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS LES OVOCYTES EN COURS DE CROISSANCE

L'incubation de fragments d'ovaires nous a permis d'étudier l'incorporation de la cytidine et de la thymidine dans les différents éléments de cet organe.

— La thymidine à 2 μ c/ml s'incorpore après une heure d'incubation dans les noyaux de quelques rares ovocytes très jeunes. Après cinq heures d'incubation, l'incorporation nucléaire intéresse un plus grand nombre de ces ovocytes très jeunes ; elle y est parfois faible, mais en général intense, et même souvent massive.

— La cytidine à 20 μ c/ml s'incorpore, à partir d'une heure d'incubation, plus faiblement que la thymidine, mais dans un très grand nombre de noyaux d'ovocytes jeunes. En outre, de nombreux ovocytes avancés montrent, après 5 heures d'incubation, un marquage nucléaire, qui n'est jamais très intense, et très souvent est associé au nucléole. Ces marquages après une heure sont faibles et rares.

Avec les deux précurseurs, on observe le marquage de certains noyaux appartenant à l'épithélium péritonéal.

En définitive, il s'avère que la thymidine s'incorpore seulement dans les plus jeunes ovocytes. On peut donc supposer l'existence d'une phase de synthèse active de l'ADN au début de l'ovogenèse. Cette phase est sans doute brève car le nombre des noyaux marqués reste faible. La cytidine, au contraire, s'incorpore de façon plus uniforme mais plus faiblement aussi ; le marquage correspondant est éliminé par la ribonucléase, mais résiste à l'action de la désoxyribonucléase. On peut supposer que, dans les jeunes ovocytes, la synthèse nucléaire de l'ARN est répartie sur une plus longue durée que celle de l'ADN, ce qui expliquerait le plus grand nombre de noyaux marqués par la cytidine. Il reste cependant difficile d'expliquer pourquoi, dans les ovocytes en fin de croissance, le marquage nucléaire par la cytidine n'apparaît pas dès le début de l'incubation.

On est surpris également de constater l'absence de tout marquage cytoplasmique net, bien que l'ovogenèse comporte vraisemblablement une synthèse active d'ARN cytoplasmique. Peut-être faut-il incriminer, dans ces résultats, le caractère non physiologique des conditions expérimentales employées. En l'absence d'autres expériences, ces résultats devront être considérés avec prudence ; il serait tout à fait prématuré de tenter une comparaison entre nos observations dans ce domaine, de caractère préliminaire, et les résultats des nombreuses études sur l'incorporation de précurseurs marqués, au cours de l'ovogenèse.

VII. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

L'ensemble des observations effectuées nous apporte des indications sur plusieurs points importants du métabolisme de l'œuf d'oursin au début de son développement. Les problèmes les plus complexes sont soulevés par l'enchaînement des synthèses qui conduisent aux acides nucléiques. Des données plus simples ressortent au sujet de la localisation de ces synthèses dans la cellule.

I - Le métabolisme des acides nucléiques.

Nous ne reviendrons pas ici sur la discussion concernant les relations entre les divers précurseurs des acides nucléiques. Cette discussion nous a longuement retenus plus haut. Mais un autre fait apparaît ici, déjà mis en évidence par les observations de Nigon et Nonnenmacher (1960). Alors que la concentration d'ADN dans l'œuf vierge avoisine 10^{-5} , une concentration de thymidine exogène de l'ordre de 10^{-8} suffit à déterminer un marquage visible de l'ADN. Pour obtenir le même résultat, les concentrations d'uridine et de cytidine nécessaires sont de 10^{-7} , bien que ces substances participent à des synthèses très diverses. A moins d'admettre un pouvoir de concentration particulièrement élevé de l'œuf vis-à-vis des nucléosides exogènes, l'efficacité de ces nucléosides semble difficilement compatible avec une hypothèse d'après laquelle l'ADN des premiers noyaux résulterait de l'utilisation directe d'une réserve macromoléculaire, sans

que celle-ci ait à traverser une phase intermédiaire de dégradation. Il est possible que l'augmentation rapide des nucléotides acidosolubles qui, d'après Olsson (1961), intervient dans les cinq minutes qui suivent la fécondation, représente précisément la mobilisation de ces réserves. Sans doute des études quantitatives poursuivies par voie chimique, sont-elles souhaitables pour déterminer la part respective des divers précurseurs dans l'élaboration de l'ADN. Mais, dès à présent, il apparaît que, sur ce matériel au moins, « l'ADN de réserve », s'il existe véritablement, ne saurait jouer un rôle génétique et participerait tout au plus au pool des précurseurs endogènes.

2 - La localisation des synthèses.

Si l'emploi des méthodes autoradiographiques ne peut apporter de solutions définitives aux problèmes que pose l'analyse des voies du métabolisme, ces méthodes sont irremplaçables pour déceler le lieu des synthèses. La localisation purement nucléaire des synthèses d'ADN ne nous retiendra pas. En revanche, la synthèse de l'ARN apporte des observations intéressantes. Durant l'ovogenèse, elle paraît s'effectuer exclusivement dans le noyau, principalement au niveau du nucléole. Durant la segmentation, au contraire, le métabolisme de l'ARN semble réparti entre le noyau et le cytoplasme, sans prédominance dans l'une ou l'autre de ces structures. Sans doute ne peut-on pas exclure l'existence éventuelle d'un transfert d'ARN, du noyau vers le cytoplasme. Cependant, aucune observation directe ne vient étayer cette hypothèse que l'absence de nucléole rend particulièrement peu vraisemblable. Faut-il voir, dans ce fait, une explication, partielle au moins, à l'influence matrocline qui paraît souvent l'emporter dans les premières phases du développement ? L'ARN cytoplasmique tirerait alors son origine d'un modèle formé durant l'ovogenèse et qui ne pourrait donc être qu'un modèle maternel. Une telle hypothèse conduirait à chercher à partir de quel stade du développement le noyau devient capable de déverser de l'ARN dans le cytoplasme.

Enfin, les observations relatives à la fixation des acides aminés tritiés sont à la fois pleines d'intérêt et fort surprenantes. Que l'intense activité des noyaux durant la segmentation comporte une synthèse protéique abondante n'est pas pour nous étonner. Une certaine prudence s'impose toutefois par suite de la discordance entre nos observations et celles d'Immers (1959-1961) et de Markman (1961). Sans doute ces auteurs ont-ils employé des acides aminés différents, mélange de 14 acides aminés pour Immers, leucine pour Markman. Mais nous-mêmes avons employé des acides aminés de natures bien différentes, méthionine S^{35} , glycine et tyrosine tritiées, qui tous trois nous ont apporté des résultats concordants. On notera toutefois que la concentration nucléaire du marquage est moins évidente dans le cas de la méthionine. Peut-être tenons-nous là une explication des différences entre nos résultats et ceux des auteurs suédois. Ces derniers ont employé comme marqueur le C^{14} , dont le rayonnement, comme celui du S^{35} , est trop pénétrant pour permettre aisément une résolution très fine. De plus, les activités spécifiques qu'ils utilisent (10 mc/mM) sont très inférieures à celles que nous employons pour les précurseurs tritiés (environ 200 mc/mM). Enfin, pour Markman surtout, les durées

d'incubation sont brèves et ne dépassent pas 10 minutes. De cet ensemble de facteurs ont résulté des marquages plus faibles que les nôtres, d'où une relative incertitude dans la localisation des marquages obtenus par Immers et Markman. D'autre part, nous avons opéré sur *Arbacia* tandis que les auteurs suédois ont utilisé d'autres espèces. Or, Immers constate, entre les espèces qu'il étudie, des différences notables dans la localisation du marquage. De sorte que, là encore, nos discordances peuvent trouver une explication.

D'autre part, la localisation du marquage, différente selon les stades considérés, ne constitue pas une observation isolée. Elle a été notée également, dans le développement des Amphibiens, par Waddington et Sirlin (1959) ; dans les cellules mésoblastiques de la gastrula, l'incorporation nucléaire de phénylalanine l'emporte sur l'incorporation cytoplasmique, tandis qu'à des stades plus avancés, c'est l'inverse qui est observé.

Un autre fait intéressant réside dans l'intervalle de temps qui s'écoule entre le début de la synthèse d'ADN et celui de la synthèse de protéines nucléaires. En effet, l'incorporation de thymidine tritiée est visible dès la prophase de la première division de segmentation. Or, l'incorporation nucléaire d'acides aminés tritiés ne semble guère apparaître avant la fin de la seconde ou de la troisième division. Ainsi la synthèse de protéines nucléaires n'est liée à celle de l'ADN que par une voie indirecte ; elle ne saurait être considérée comme une simple expression de la division chromosomique. La question de sa signification exacte se trouve donc posée et ne pourra être résolue que par de nouvelles expériences.

Summary

During the cleavage of *Arbacia lixula*, tritiated thymidine added to sea water is incorporated essentially in nuclear DNA. Cytidine and uridine are taken up for the most part by nuclear DNA and for a small part by nuclear and cytoplasmic RNA. The incorporation is observed by autoradiography if more than 2 $\mu\text{c}/\text{ml}$ of tritiated thymidine are present in the sea water. The same results are obtained with concentrations of 20 $\mu\text{c}/\text{ml}$ of cytidine or uridine. The addition of an excess of cold thymidine reduces tritiated uridine and cytidine uptake, while the addition of an excess of uridine reduces thymidine incorporation.

During the past two hours after fertilization, labellings given by radioactive amino-acid incorporation occur mostly in the cytoplasm. Later, the labellings are observed predominantly in the nuclei. These results tend to prove that in the first hours of development the metabolism of nuclear proteins is altered.

When ovary pieces are exposed, *in vitro*, to tritiated cytidine and uridine, the incorporation is limited to the nuclei, and sometimes to the nucleoli.

Zusammenfassung

Während der Furchung der Eizellen von *Arbacia lixula* stellt man fest, dass dem Meerwasser zugesetztes, tritiiertes Thymidin der DNS des Kerns eingebaut wird ; Cytidin und Uridin werden meistens auch in die DNS des Kerns inkorporiert ; teilweise gehen aber die letztgenannten Substanzen in die RNS des Kerns und des Cytoplasmas über. Die Schranke der autoradiographisch sichtbaren Markierung ist gegeben durch einen H^3 -Thymidin Gehalt des Meerwassers von 2 $\mu\text{c}/\text{ml}$; mit Uridin oder Cytidin sind 20 $\mu\text{c}/\text{ml}$ nötig. Die Zugabe von kaltem Thymidin in grösster Menge hemmt die Inkorporierung von Uridin und Cytidin ; dagegen kann Uridin den Einbau von Thymidin hemmen.

In den ersten zwei Stunden nach der Befruchtung sieht man radioaktive Aminosäuren sich meistens in den cytoplasmatischen Strukturen einbauen; später erkennt man vorwiegend eine Inkorporierung in den Kern, was für einen Wechsel in der Synthese der Proteine des Kerns zu sprechen scheint.

Ovarienfragmente können, *in vitro*, H³-Cytidin oder -Thymidin erhalten. In diesem Falle ist die Markierung auf den Kern oder sogar auf die Nucleolen beschränkt.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- BERECH, S. et VAN WAGTENDONK, W.J., 1962. — An autoradiographic study of the macronuclear changes occurring in *Paramecium aurelia* during autogamy. *Exp. Cell Res.*, 26, pp. 360-372.
- BRACHET, J., 1958. — The effect of various metabolites and antimetabolites on the regeneration of *Acetabularia mediterranea*. *Exp. Cell Res.*, 14, pp. 650-651.
- BUCHER, N. et MAZIA, D., 1960. — DNA synthesis in relation to duplication of centers in dividing eggs of sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Bioph. Biochem. Cyt.*, 7, pp. 551-655.
- COLE, W.H., 1940. — The composition of fluids and sera of some marine animals and of the sea water in which they live. *J. Gen. Physiol.*, 27, pp. 575-584.
- DAVIDSON, J.N., 1961. — Problems of polynucleotide biosynthesis. Biological structure and functions. Ist IUB/IUBS Symposium *Stockholm*, pp. 95-102.
- ELSON, D., GUSTAFSON, T. et CHARGAFF, E., 1954. — The nucleic acids of the sea urchin during embryonic development. *J. Biol. Chem.*, 209, pp. 285-294.
- FEINENDEGEN, L.E., BOND, V.P. et HUGUES, W.L., 1961. — RNA mediation in DNA synthesis in HeLa cells studied with tritium labelled cytidine and thymidine. *Exp. Cell Res.*, 25, pp. 627-647.
- FENEVAUX, L., 1961. — Etude cytochimique des groupes sulfhydryles au cours des modifications de la détermination embryonnaire chez l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*. *Experientia*, 17, pp. 315-317.
- FIGQ, A., 1954. — Analyse de l'induction neurale par autoradiographie. *Experientia*, 10, pp. 20-21.
- FIGQ, A., 1955. — Etude autoradiographique du métabolisme de l'oocyte d'*Asterias rubens* au cours de la croissance. *Arch. Biol.*, 66, pp. 509-524.
- FINK, R.M. et FINK, K., 1961. — Biosynthesis of radioactive RNA and DNA pyrimidine from thymidine 2-C¹⁴. *Bioph. Biochem. Res. Comm.*, 6, pp. 7-10.
- FINK, R.M. et FINK, K., 1962. — Biological conversion of thymidine to non methylated pyrimidine. *Fed. Proc.*, 21, p. 377.
- FRIEDKIN, M., TILSON, D. et ROBERTS, D.W., 1956. — Studies of deoxyribonucleic acid biosynthesis in embryonic tissues with thymidine C¹⁴. *J. Biol. Chem.*, 220, pp. 620-638.
- GIUDICE, G. et MONROY, A., 1958. — Incorporation of S³⁵ methionine in the proteines of the mitochondria of developing and parthenogenetically activated sea urchin eggs. *Acta Embryol. Morphol. exper.*, 2, pp. 58-65.
- HAMMARSTEN, E., REICHARD, P. et SALUSTE, E., 1950. — Pyrimidine nucleoside as precursors of pyrimidines in polynucleotides. *J. Biol. Chem.*, 183, pp. 105-109.
- HULTIN, T., 1950. — The protein metabolism of sea urchin eggs during early development studied by means of N¹⁵ labelled ammonia. *Exp. Cell Res.*, 1, pp. 599-602.
- HULTIN, T., 1953. — Incorporation of N¹⁵ labelled ammonium chloride into pyrimidines and purines during the early sea urchin development. *Arkiv Kemi*, 5, pp. 267-275.
- HULTIN, T., 1961. — The effect of puromycine on protein metabolism and cell division in fertilized sea urchin eggs. *Experientia*, 17, pp. 410-411.
- IMMERS, J., 1959. — Autoradiographic studies on incorporation of C¹⁴ labelled algal protein hydrolysate in the early sea urchin development. *Exp. Cell Res.*, 18, pp. 585-588.
- IMMERS, J., 1961. — Comparative study of the localization of incorporated C¹⁴ labelled aminoacids and S³⁵ O₃ in the sea urchin ovary, egg and embryo. *Exp. Cell Res.*, 24, pp. 356-378.
- KAWAMURA, N. et DAN, J., 1958. — A cytochemical study of the sulfhydryl groups of sea urchin eggs during the first cleavage. *J. Bioph. Biochem. Cytol.*, 4, pp. 615-619.

- MALEY, G.F. et MALEY, F., 1960. — Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in chick embryos by deoxyadenosine. *J. Biol. Chem.*, 235, pp. 2.964-2.967.
- MARKMAN, B., 1961. — Differences in isotopic labelling of nucleic acid and protein in sea urchin embryos developing from animal and vegetal egg halves. *Exp. Cell Res.*, 25, pp. 224-227.
- MAZIA, D., 1961. — Mitosis and the physiology of cell division in «*The Cell*», Brachet et Mirsky. Academic Press, pp. 77-394.
- MONROY, A. et NAKANO, E., 1959. — Evolution of the methods for the incorporation of radioactive compounds in the echinoderm eggs. *Publ. Staz. Zool. Napoli*, 31, pp. 95-99.
- NAKANO, E. et MONROY, A., 1958. — Some observations on the metabolism of S³⁵ methionine during development of the sea-urchin eggs. *Experientia*, 14, pp. 367-368.
- NAKANO, E. et MONROY, A., 1958. — Incorporation of S³⁵ methionine in the cell fractions of sea urchin eggs and embryos. *Exp. Cell Res.*, 14, pp. 236-244.
- NIGON, V. et NONNENMACHER, J., 1961. — L'incorporation de la thymidine tritiée durant l'ovogenèse de la Drosophile. *Developmental Biology*, 3, pp. 210-224.
- NIGON, V. et NONNENMACHER, J., 1960. — Etude autoradiographique de l'incorporation de thymidine tritiée dans des œufs d'*Arbacia lixula*. *C.R. Acad. Sc., Paris*, 251, pp. 1.427-1.429.
- NIGON, V. et GILLOT, S., 1962. — L'incorporation de la thymidine au cours de l'ovogenèse et du développement embryonnaire chez la Drosophile (*sous presse*).
- OLSSON, T., 1961. — Estimation of ribonucleic acid, acidoluble nucleotides and nuclease activity during the caryogamic period of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Ark. Zool.*, 13, pp. 89-93.
- PRUSOFF, W.H., 1958. — Studies on a relationship of uracil and cytosine nucleosides to biosynthesis of deoxyribonucleic acid thymine. *J. Biol. Chem.*, 231, pp. 873-881.
- REICHARD, P., 1961. — Enzymic formation of deoxyribonucleic acid from ribonucleotides. *Biol. structure and function*. 1st IUB/IUBS Symposium, *Stockholm*, pp. 103-112.
- REICHARD, P., CANELLAKIS, Z.N. et CANELLAKIS, E.S., 1960. — Regulatory mechanism in the synthesis of deoxyribonucleic acid in vitro. *Bioch. Bioph. Acta*, 41, pp. 558-559.
- REICHARD, P. et ESTBORN, B., 1951. — Utilization of deoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *J. Biol. Chem.*, 188, pp. 839-846.
- ROBERTSON, J.D., 1939. — The inorganic composition of the body fluids of three marine invertebrates. *J. Exp. Biol.*, 16, pp. 287-397.
- SELLS, B.H., 1960. — The effect of thymidine upon the incorporation of uracil into *Bacillus cereus*. *Bioch. Bioph. Acta*, 40, pp. 548-549.
- SIRLIN, J.L., 1955. — Nuclear uptake of methionine S³⁵ in the newt embryo. *Experientia*, II, pp. 112-113.
- SIRLIN, J.L. et WADDINGTON, C.H., 1954. — Nuclear uptake of glycine-2-C¹⁴ in the newt embryo. *Nature*, 174, p. 309.
- VILLEE, C.H., LOWENS, M., GORDON, M., LEONARD, E. et RICH, A., 1949. — The incorporation of p³² in the nucleoprotein and phosphoprotein of the developing sea urchin embryo. *J. cell comp. Physiol.*, 33, pp. 93-112.
- WADDINGTON, C.H. et SIRLIN, J.L., 1959. — The changing pattern of aminoacid incorporation in developing mesoderm cells. *Exp. cell Res.*, 17, pp. 582-585.
- XEROS, N., 1962. — Deoxyriboside control and synchronisation of mitosis. *Nature*, 194, pp. 682-683.