

So. 376

1967

12

1

UNIVERSITE DE LILLE  
FACULTE DES SCIENCES

50376  
1967  
12  
1

ETUDE DU SORT DU DNA INJECTE CHEZ LA SOURIS

Pol CHARLES

Section de Biochimie cellulaire  
Département de Radiobiologie  
Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire  
MOL (Belgique).



Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Docteur ès Sciences d'Université devant  
la Commission d'examen le 11 mars 1967.

MM. J.Montreuil : Président  
P.Boulanger : Rapporteur  
G.Biserte et J.Guillaume : Assesseurs  
J.R.Maisin : Membre invité

Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude aux Professeurs P.Boulanger et J.Montreuil de la confiance qu'ils nous ont témoignée et de l'intérêt qu'ils ont bien voulu manifester à notre travail.

Nos vifs remerciements vont également aux Professeurs G.Biserte, F.Segard et J.Guillaume qui ont bien voulu examiner et critiquer notre mémoire.

Il nous est particulièrement agréable de remercier ici le Dr.L.Ledoux qui a accepté de guider nos recherches et dont les conseils et encouragements nous ont été très précieux.

Nous remercions également le Professeur M.Errera qui nous a fait bénéficier, à maintes reprises, de ses critiques et de ses suggestions.

Nous remercions la Direction du Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire à Mol, ainsi que le Dr.J.R.Maisin, chef du département de Radiobiologie, dont l'aide efficace nous a permis de réaliser ce travail.

Qu'il nous soit permis de remercier également tous nos amis du laboratoire de Biochimie cellulaire pour leur esprit de collaboration et d'entr'aide.

Ce travail n'aurait pas été possible sans les subsides du Fonds de la Recherche scientifique fondamentale collective et sans l'aide financière des services de Biologie de l'Euratom. Que les responsables de ces organismes trouvent ici l'expression de notre reconnaissance.

UNIVERSITE DE LILLE - FACULTE DES SCIENCES

---

DOYENS HONORAIRES

MM. PRUVOST  
LEFEBVRE  
PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ARNOULT	MM. FLEURY	MM. PARISELLE
BEGHIN	GERMAIN	PASCAL
CAU	KOURGANOFF	PAUTHENIER
CHAPELON	LANOTTE	RUIG
CHAUDRON	LELONG	ROSEAU
CORDONNIER	Mme. LELONG	ROUBINE
DE HEUVELS	MM. MAZET	WIEMANN
DEHORNE	MICHEL	ZAMANSKY
DOLLE	NORMANT	KAMPE DE FERIET

D O Y E N

M. TILLIEU, Professeur de Physique

ASSESEURS

MM. DURCHON, Professeur de Zoologie  
HEUBEL Professeur de Chimie Minérale

PROFESSEURS

MM. BACCHUS	Astronomie, Calcul numérique
BECART	Physique
BERKER	Médanique des Fluides

MM.	BLOCH	Psychophysiologie
	BONNEMAN BEMIA	Chimie et Physico-Chimie industr.
	BUNTE	Géologie appliquée
	BOUGHON	Mathématiques
	BOUISSET	Physiologie animale
	BOURIQUET	Botanique
	CELET	Géologie
	CORSIN	Paléobotanique
	DECUYPER	Mathématiques
	DEDEKER	Professeur Associé de Mathématiques
	DEFRETIN	Biologie marine
	DEHORS	Physique industrielle
	DELATTRE	Géologie
	DELEAU	Géologie
	DELHAYE	Chimie minérale
	DESCOMBES	Calcul différentiel & intégral
	FOURET	Physique
	GABILLARD	Radioélectricité & Electronique
	GLACET	Chimie
	GONTIER	Mécanique des Fluides
	HEIM DE BALZAC	Zoologie
	HOCQUETTE	Botanique générale & appliquée
	LEBEGUE	Botanique
Mme.	LEBEGUE	Physique
M.	LEBRUN	Radioélectricité & Electronique
Melle.	LENOBLE	Physique
MM.	LIEBAERT	Radioélectricité
	LINDER	Botanique
	LUCQUIN	Chimie minérale
	MARION	Chimie
Melle.	MARQUET	Mathématiques
MM.	MARTINOT-LAGARDE	Mécanique des Fluides
	MENESSIER	Géologie
	MONTARIOL	Chimie minérale appliquée
	MONTREUIL	Chimie biologique
	MORIAMEZ	Physique

MM.	PARREAU	Mathématiques
	PEREZ	Physique expérimentale
	PHAM MAU QUAN	Mécanique rationnelle & expérimentale
	POUZET	Calcul numérique
	PROUVOST	Géologie
	SAVARD	Chimie générale
	SCHALLER	Zoologie
	SCHILTZ	Physique
Mme.	SCHWARTZ	Analyse supérieure
MM.	TRIDOT	Chimie
	VIVIER	Biologie animale
	WATERLOT	Géologie & Minéralogie
	WERTHEIMER	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	ATTEIA	Mathématiques
	BEUFILS	Chimie générale
	BELLET	Physique
	BLANCHARD	Chimie organique
	BOILLET	Physique
	BUI TRONG LIEU	Mathématiques
	CHASTRETTE	Chimie générale AMIENS
	CHERRUAULT	Mathématiques
	COMBET	Mathématiques
	CONSTANT	Radioélectricité & Electronique
	DERCOURT	Géologie & Minéralogie
	DEVRAINE	Chimie minérale
Mme.	DRAN	Chimie appliquée
MM.	GOUDMAND	Chimie physique
	GUILLAUME	Botanique
	HENRY	Physique AMIENS
	HERZ	Calcul numérique
	HUARD DE LA MARRE	Calcul numérique
	JOLY	Zoologie AMIENS

MM.	LACOSTE	Botanique	
	LAMBERT	Physique	SAINT QUENTIN
	MAES	Physique	
	METTETAL	Zoologie	AMIENS
	NOUVIER	Chimie	SAINT QUENTIN
	NGUYEN PHONG CHAU	Mathématiques	SAINT QUENTIN
	PANET	Electromécanique	
	PARSY	Mathématiques	AMIENS
	RAUZY	Mathématiques	
	SAADA	Physique	
	SEGARD	Chimie biologique	
	TUDO	Chimie	AMIENS
	VAILLANT	Mathématiques	
	VAZART	Botanique	AMIENS
	VIDAL	Physique industrielle	

SECRETAIRE GENERAL, ATTACHE PRINCIPAL

M. LEGROS.

## Table des matières

	Pages.
<u>Introduction</u> . . . . .	1.
 <u>Matériel et Méthodes</u>	
1. Produits non-radioactifs . . . . .	20.
2. Produits radioactifs . . . . .	22.
3. Manipulation des animaux . . . . .	25.
4. Séparation chimique des acides nucléiques . . . . .	25.
5. Chromatographie des acides nucléiques	
5.1 - Préparation de la résine . . . . .	29.
5.2 - Préparation des homogénats . . . . .	29.
5.3 - Méthode . . . . .	30.
6. Estimation de la radioactivité . . . . .	31.
7. Dosage des acides nucléiques	
7.1 - Par spectrophotométrie dans l'ultra-violet. . . . .	32.
7.2 - Par colorimétrie du sucre constitutif . . . . .	33.
8. Dosage des protéines . . . . .	34.
9. Viscosimétrie . . . . .	35.
10. Autoradiographie . . . . .	36.
11. Centrifugation en gradient de densité . . . . .	38.
11.1 - Préparation des échantillons de tissus animaux . . . . .	38.
11.2 - Centrifugation . . . . .	40.
11.3 - Fractionnement . . . . .	40.

Etude par chromatographie de modifications provoquées du DNA

1. Cinétique de l'action de la DNase . . . . .	43.
2. Cinétique de la dénaturation thermique . . . . .	45.

Etude du sort du DNA injecté chez la souris . . . . .

1. Le sang	
1.1 - Etude biochimique . . . . .	49.
1.2 - Etude chromatographique . . . . .	54.
1.3 - Etude par ultracentrifugation en gradient de CsCl . . . . .	56.
Discussion . . . . .	58.
2. Les organes	
2.1 - Etude de la distribution de la radioactivité dans l'animal . . . . .	60.
2.2 - Etude du degré de polymérisation des molécules radioactives par chroma- tographie sur pulpe de papier de DEAE-cellulose . . . . .	63.
2.3 - Recherche de la nature des molécules radioactives. Etude de l'intégrité des structures primaire et secondaire par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium . . . . .	70.
2.4 - Localisation cellulaire de la radioactivité par autoradiographie . . . . .	73.

Discussion générale . . . . .

Résumé général . . . . .

Bibliographie . . . . .



## INTRODUCTION

---

A la fin du siècle dernier, MIESCHER (1897) isolait les acides nucléiques et les recherches qui suivirent cette importante découverte portèrent principalement, pendant plusieurs décennies, sur la connaissance chimique de ces macromolécules. Elles amenèrent à l'identification de deux types d'acides nucléiques : les acides ribo- et désoxyribo-nucléiques.

Les bases puriques découvertes par PICCARD (1874) furent surtout connues par les travaux de KOSSEL (1879, 1888).

Les bases pyrimidiques furent isolées et identifiées par KOSSEL et NEUMANN (1894), KOSSEL et STENDEL (1902, 1903); LEVENE (1902, 1903) et ASCOLI (1900).

Ce furent les études sur les levures et le thymus qui apportèrent vers 1930 une image précise des deux types d'acides nucléiques. Dès cette époque, tous les composants en étaient connus.

- Pour les levures, quatre bases azotées : adénine - guanine - cytosine - uracile, de l'acide phosphorique et un sucre identifié comme étant du ribose ;
- Pour le thymus, quatre bases azotées : adénine - guanine - cytosine - thymine, de l'acide phosphorique et un sucre identifié comme étant du désoxyribose

Des tests histochimiques permirent alors l'étude de la localisation des acides nucléiques dans la cellule et ce furent des travaux d'ordre biologique qui contribuèrent le plus au déve-

loppement de nos connaissances concernant ces constituants cellulaires essentiels.

A la suite des travaux de BRACHET (1933) et de FEULGEN, BEHRENS, MAHDIAASSAN (1937), les deux types d'acides nucléiques se sont révélés être des constituants universels de toute cellule animale ou végétale.

La réaction nucléaire de FEULGEN qui est spécifique pour les acides nucléiques à désoxypentose, fut employée pour démontrer que ce type d'acide nucléique est localisé dans le noyau cellulaire.

D'une façon similaire, le test à la ribonucléase de BRACHET permet de démontrer la présence d'acide nucléique à pentose dans le cytoplasme cellulaire et dans le noyau (chromatine-nucléole).

De plus, BRACHET (1933) et ensuite SCHULTZ et CASPERSON (1940), en conclusion de leurs travaux, émirent l'hypothèse d'une participation des acides nucléiques dans les synthèses protéiques.

La possibilité que les acides désoxyribonucléiques peuvent jouer un rôle dans les mécanismes génétiques fut suggérée. On savait que le DNA était localisé dans le noyau et que tous les noyaux contenaient du DNA. Il était presque inévitable qu'on attribue au DNA un rôle génétique dès que les processus dans lesquels il intervient (mitose, méiose, fécondation) furent considérés comme étant des processus de transmission de caractères héréditaires. Les recherches prirent une orientation nouvelle lorsque GRIFFITH, après avoir réalisé en 1928, la première démonstration claire "in vivo" du phénomène de transformation, émit l'hypothèse (1935) que les gènes pourraient posséder une nature purement nucléaire.

GRIFFITH avait découvert que si l'on injecte à une sou-  
ris des pneumocoques non encapsulés en présence de pneumocoques  
encapsulés tués, ils peuvent acquérir de nouveau, de façon héréditaire, la faculté de synthétiser une capsule. Dans cette découverte, le point le plus remarquable était que la nature de la capsule formée ne dépend pas de l'origine du pneumocoque sans capsule, mais du type de pneumocoque tué injecté en même temps que lui. C'est le phénomène de la transformation des types de pneumocoques ou des mutations dirigées.

Cependant, il fallut attendre encore une dizaine d'années avant que soit mis en évidence le rôle essentiel de l'acide désoxyribonucléique comme porteur de l'information génétique. Cette notion qui, par la suite, devait se révéler extrêmement importante et fructueuse, nous la devons à deux biologistes, O.T.AVERY et A.BOIVIN.

L'école d'AVERY (1944 et TAYLOR, 1949) reprit les études de GRIFFITH "in vitro". Ces auteurs réalisèrent alors également de telles transformations, mais en utilisant cette fois des extraits de pneumocoques encapsulés privés de toute cellule. Simultanément en France, l'école de BOIVIN (1948, 1949 - VENDRELY, 1950 - VENDRELY et VENDRELY, 1948, 1949) réalisait de semblables transformations sur d'autres souches bactériennes (E.coli).

Le facteur transformant avait pu être isolé et identifié comme étant de l'acide désoxyribonucléique (HOTCHKISS, 1949 ; ZAMENHOF, ALEXANDER et LEIDY, 1953). En effet, les transformations avaient pu être induites par des préparations de DNA isolés à partir des différents types de bactéries.

Ces préparations, selon HOTCHKISS (1949), ne contenaient que des traces d'impuretés et voyaient leur pouvoir transformant détruit par l'action de la désoxyribonucléase, tandis que ce pouvoir était maintenu après action de diverses protéases.

Dès ce moment, d'autres essais eurent lieu dans le sens d'une recherche d'effets biologiques spécifiques dont le DNA serait le principe actif ; c'est ainsi que MAZIA (1949) observe une inhibition du développement d'embryons cultivés dans des milieux contenant du DNA de l'espèce homologue. Toutefois, ces observations ne peuvent être confirmées ; THOMAS, STEINERT, GOTHIE et BRACHET (1952), étudiant le développement d'oeufs fécondés de divers amphibiens dans des solutions de DNA de provenances diverses, n'observèrent aucun résultat comparable à ceux de MAZIA.

Cependant, la notion selon laquelle l'acide désoxyribonucléique serait porteur de l'information génétique, se trouva confirmée par les résultats d'autres travaux parmi lesquels il faut citer ceux de HERSHEY et CHASE (1952) qui montrèrent que seul le DNA du bactériophage est transmis de génération en génération.

La portée de ces découvertes était considérable ; une substance chimique s'était révélée capable d'induire la transformation d'une espèce vivante en lui permettant de réaliser des synthèses nouvelles ; un DNA étranger était capable de conférer une expression phénotypique nouvelle, caractéristique de la souche donneuse et cette modification était héréditaire, comme si la molécule responsable s'incorporait au patrimoine génétique de l'espèce.

Par la suite, les recherches sortirent du cadre de la bactériologie, qui fournissait au départ un matériel de choix et

s'étendirent aux cellules de mammifères qui, en culture in vivo ou in vitro, offraient de grandes possibilités pour l'étude d'une utilisation possible d'un DNA exogène.

C'est ainsi que WILCZOK (1961, 1962, 1962<sup>a</sup>) admet que les cellules de l'hépatome ascitique de NOVIKOFF utilisent, in vitro, du DNA, tant homologue qu'hétérologue. Avec des cellules d'Ehrlich comme matériel, cette fois, ce même auteur montre que ces cellules utilisent moins bien un DNA dénaturé par la chaleur ou dégradé par action mécanique qu'un DNA polymérisé fraîchement préparé<sup>(x)</sup>.

SIROTNAK et HUTCHINSON (1959) obtiennent une prise rapide de DNA marqué au <sup>32</sup>P dans des cellules L 1210 cultivées in vivo.

AMOS (1961) observe, sur embryon de poulet, que les cellules sont capables d'ingérer du DNA hétérologue, d'autant mieux s'il est donné sous forme de nucléoprotéine (DNA gainé de protamine) protégé ainsi d'une action éventuelle de la DNase endogène.

BORENFREUND, ROSENKRANZ et BENDICH (1959) observent également une prise de DNA exogène par des cellules de mammifère en culture de tissus.

BORENFREUND et BENDICH (1961) confirment par autoradiographie leurs résultats entérieurs et montrent que le DNA ou ses produits de dégradation, qui ont été absorbés par les cellules HeLa, sont localisés au niveau du noyau et que la radioactivité peut en être enlevée quantitativement par l'action de la DNase.

---

(x) Ces observations ont été confirmées par MEIZEL et KAY (1966).

BENDICH (1961) montre que lorsque les cellules HeLa en culture sont mises en présence de DNA tritié in vitro pendant 24 heures à 37°C, une quantité égale à environ 10 % du contenu en DNA des cellules est incorporée par les cellules. Si l'expérimentation est faite à 4°C, on n'observe que peu ou pas de marquage des cellules.

D'autres auteurs, en conclusion de leurs travaux, arrivent aux mêmes observations (KING et BENSCH, 1960 ; CHORAZY, BALDWIN et BOUTWELL, 1960 ; CHORAZY, 1962 ; CHORAZY et BENDICH, 1963 ; RABOTTI, 1963).

Dans la plupart des travaux, on ne pouvait cependant rejeter l'intervention possible d'un mécanisme de dégradation suivi de resynthèse.

Ce dernier mécanisme semble pouvoir être exclu, suite aux expériences de RIEKE (1962) et à celles de WILCZOK (1962) qui, sur cellules de tumeur ascitique, montrent que l'utilisation est meilleure lorsqu'on fournit le DNA polymérisé (homologue ou non) que lorsqu'on fournit les produits de dégradation enzymatique (DNase) de ce même DNA.

SUNG et QUASTEL (1963), étudiant les effets de l'irradiation sur le DNA, observent que les cellules d'ascite acceptent moins bien le DNA irradié que le DNA natif ou même dénaturé par la chaleur.

Des arguments plus directs en faveur d'une utilisation sans dégradation préalable du DNA, sont fournis par d'autres auteurs.

GARTLER (1959, 1960) utilise du DNA marqué au  $^{14}\text{C}$ , ce qui lui permet d'apprécier la quantité de DNA utilisée, et du DNA marqué par un atome lourd (grâce à la 5-bromo-désoxyuridine), qui lui permet de suivre par centrifugation en gradient de chlorure de césium le sort du DNA ingéré. L'auteur montre que les cellules de la lignée L de Earle, absorbent une quantité de DNA homologue égale à environ 1 % du DNA constitutif et que ce DNA est ingéré sans grande modification car il retrouve, associé au DNA des cellules hôtes, un DNA qui possède les mêmes propriétés (densité et largeur de bande dans le gradient) que le DNA fourni.

BENSCH, SIMBONIS, HILL et KING (1959), ainsi que BENSCH et KING (1961) arrivent à des conclusions analogues en utilisant du DNA associé à une protéine.

KAY (1961) observe une incorporation de DNA extracellulaire de poids moléculaire élevé dans le DNA nucléaire des cellules de tumeur d'ascite d'Ehrlich-Létré lorsque ces dernières sont incubées in vitro. Le DNA exogène ne subit pas, ou peu, de remaniement et est incorporé dans le DNA cellulaire.

SCHIMIZU, KOYAMA et IWAFUCHI (1962) pensent pouvoir conclure de leurs expériences que les cellules de la tumeur d'ascite d'Ehrlich peuvent utiliser du DNA homologue ou non, par un processus qui n'est pas inhibé au même titre que la synthèse du DNA, par la présence de l'uracile-méthyl sulfone, ce qui écarte l'intervention exclusive d'un mécanisme de synthèse à partir de produits d'hydrolyse du DNA fourni.

D'autres auteurs ont poussé l'expérimentation plus loin encore.

HILL et DRASIL (1960), HILL (1961, 1961a), HILL et JAKUBICKOVA (1962) et HILL (1962) injectent, par voie intraveineuse, des lymphocytes marqués à des souris irradiées par 800 r de rayons X, 24 heures auparavant. Ils montrent que le DNA-<sup>32</sup>P libéré à partir de ces lymphocytes se retrouve au niveau des cellules de la moelle osseuse, du thymus et de la rate. Ces observations ont été confirmées par d'autres auteurs (RIEKE, 1962 ; DUMONT, AYVAZIAN et McCLUSKEY, 1962 ; FICHTELIUS et GROTH, 1963 ; BRYANT, 1963 ; BASERGA et KISIELESKI, 1963).

DJORDJEVIC, KOSTIC et KANAZIR (1962), MILETIC, PETROVIC et ZALEC (1963) observent une restauration des cellules L irradiées par U.V. ou aux rayons X, si ces cellules sont cultivées en présence de DNA homologue polymérisé. Dans ces dernières expériences, le DNA homologue est, non seulement entré dans les cellules, mais il y a été actif puisque seules les cellules ayant été maintenues en présence de DNA peuvent être recultivées.

SMITH et CRESS (1961) étudient l'effet de DNA de tumeur sur des cultures de fibroblastes et observent une inhibition de la croissance lorsque le DNA fourni provient de cellules de tumeur d'ascite d'Ehrlich, tandis qu'ils n'observent pas d'effet avec du DNA provenant du sarcome 180.

LEUCHTENBERGER, LEUCHTENBERGER et UYEKI (1958, 1962) signalent avoir observé des changements cytologiques dans le foie de souris ayant reçu, en injection intrapéritonéale, du DNA préparé à partir de tumeur.

PODGAYETSKAYA, BRESLER et OLENOV (1959, 1962) étudient un effet positif des acides nucléiques sur la résistance aux médicaments.



FREDERIC et CORIN-FREDERIC (1962) obtiennent des résultats qui montrent l'apparition de modifications des chromosomes et du karyotype des cellules d'embryons de poulet, cultivées in vitro en présence de DNA de thymus de veau.

GIMLIN, FARQUHARSON et LEACH (1963) étudient l'effet du DNA transformant de B.subtilis marqué au bromouracil sur la croissance des cellules.

SCHIMIZU et IMAFUCHI (1962) observent, in vitro, une inhibition du développement de la tumeur ascitique en présence de DNA iodé.

MEIZEL et KAY (1965) rapportent les résultats d'expériences faites in vitro sur cellules de tumeur d'ascite Ehrlich-Lettré qui confirment, en les explicitant, ceux obtenus auparavant. Des cellules animales en culture sont capables d'incorporer, sans le dégrader, du DNA polymérisé exogène. L'examen de l'activité spécifique du rapport adénine-thymine du DNA ayant servi à l'expérimentation montre que ce rapport reste relativement constant, ce qui suggère que le DNA reste polymérisé pendant le processus de pénétration dans le noyau. L'incorporation se fait donc sans dégradation et est maximum pendant les 15 premières minutes de l'incubation. Les auteurs ont aussi observé que l'incorporation était plus importante en l'absence de glucose qu'en présence de  $2 \cdot 10^{-2}$  M de glucose, mais qu'elle était maximale à la concentration de  $2 \cdot 10^{-4}$  M de glucose. D'autre part, le fluorure de sodium inhibe l'incorporation, tandis que le dinitrophénol la stimule ; par contre, en présence de fluorure et de dinitrophénol, l'inhibition est plus grande qu'en présence de fluorure seul. Ce qui suggère que la respiration et la glycolyse sont, toutes deux, engagées dans la fourniture de l'énergie requise pour l'incorporation du DNA polymérisé dans les cellules.

Avec les résultats observés par KRAUS (1961) et SZYBALSKY, SZYBALSKA et RAGNI (1961) une nouvelle étape allait être franchie. Leurs résultats suggèrent, en effet, que le DNA incorporé a dû être intégré dans le génome des cellules hôtes.

Pour KRAUS (1961), dans la moelle osseuse humaine en culture de tissu, du DNA étranger a pu engendrer la production d'une substance qui ne se trouvait pas normalement dans le tissu. Des cellules de moelle osseuse provenant d'un malade atteint d'anémie falciforme (homozygote-hémoglobine S) ont été, en culture, mises en présence de DNA extrait de cellules de la moelle osseuse d'un individu normal (homozygote-hémoglobine A). Après une incubation suffisante, l'auteur a pu mettre en évidence, par électrophorèse et analyse des chaînes polypeptidiques de l'hémoglobine, la présence d'hémoglobine A dans les cellules provenant du porteur homozygote d'hémoglobine S. Pour les hémoglobines humaines, chaque chaîne polypeptidique synthétisée est directement apparentée à la présence d'un gène ou d'une séquence de DNA dans les chromosomes des érythroblastes précurseurs. L'apparition d'une hémoglobine "anormale" semble donc être due au fait que le DNA ajouté à la culture est entré dans les cellules et y a provoqué une modification de la synthèse de l'hémoglobine.

SZYBALSKY et SZYBALSKA (1962) effectuèrent des essais pour démontrer une transformation génétique due au DNA. Des cellules de moelle osseuse humaine en culture de tissu, incapables d'utiliser l'hypoxanthine (déficientes en I.M.P.-pyrophosphorylase) furent transformées en cellules compétentes, par incubation en présence de DNA extrait d'une souche de cellules normales. La fréquence des

transformations est du même ordre que celle observée chez certaines bactéries. Il semble bien que les cellules animales soient capables de transformations génétiques, mais les conditions expérimentales sont très difficiles car le système génétique est probablement plus complexe que chez les bactéries.

Des essais en vue de reproduire sur cellules somatiques et nucléées des transformations observées sur bactéries ont également été tentés et réussis par PODGAYETSKAYA, BRESLER, SURIKOV, IGNATOVA et OLENOV (1964).

Du DNA natif isolé à partir de cellules tumorales -souche résistante à la sarcolysine - a induit la transformation d'une souche sensible à la sarcolysine. La réaction, pour les auteurs, est spécifique ; en effet, les préparations de DNA sont inactivées par la DNase et du DNA d'autres sources est inactif. De plus, la résistance acquise par les cellules transformées est héréditaire.

Les transformations chez les bactéries sont actuellement bien établies et étudiées. A ce jour, il semble que le DNA puisse entrer intact dans certaines cellules de mammifères et devenir partie intégrante du noyau. Mais les transformations sont encore dans une phase de recherches de pionnier, même si quelques résultats très importants et significatifs ont été obtenus par certains auteurs (SZYBALSKY et SZYBALSKA, 1962 ; KRAUS, 1961 ; PODGAYETSKAYA, BRESLER, SURIKOV, IGNATOVA et OLENOV, 1964).

Pour pouvoir induire une transformation, le DNA doit traverser la membrane cellulaire, s'intégrer au matériel génétique de la cellule et y engendrer la production d'une substance ou d'une propriété qui était absente avant l'entrée du DNA.

Si de tels phénomènes sont difficiles à démontrer dans des cellules isolées ou en culture, ils seront, a priori, encore plus difficiles à mettre en évidence dans l'animal in toto.

Des recherches ont cependant été entreprises dans ce sens et les premiers travaux qui relatent, chez les animaux supérieurs, des transformations comparables à celles obtenues chez les bactéries et les cellules en culture, sont l'objet de beaucoup de discussions.

BENOIT (1957), BENOIT, LEROY, VENDRELY et VENDRELY (1957a, 1957b, 1957c, 1957d, 1958, 1959a, 1959b, 1960a, 1960b, 1960c) ont été les premiers à obtenir une modification de certains caractères phénotypiques chez le canard, grâce à la médiation d'un DNA étranger. Les auteurs ont soumis à des injections intrapéritonéales d'un extrait de DNA de canard Khaki Campbell, des canetons Pékin. Ceux-ci ont présenté, au cours de leur développement ultérieur, des modifications phénotypiques notables. Le métissage obtenu par le croisement d'animaux modifiés avec d'autres normaux, produit une descendance également modifiée. Les auteurs ont enregistré deux effets différents du DNA : l'un sur les sujets injectés aux-mêmes, l'autre plus éloigné sur la descendance, conséquence probable d'une modification permanente et apparemment stable du patrimoine héréditaire. D'autres essais furent tentés sur le même matériel, mais ni BENOIT, LEROY, VENDRELY et VENDRELY (1960b), ni SVOBODA et HASKOVA (1959), ni NOVIKOV, CHEPINOGA et LYUBARSKAYA (1961) ne purent reproduire les premières expériences de BENOIT (1957).

L'effet de l'injection de DNA étranger sur le développement des caractères héréditaires s'est avéré négatif également dans

l'expérimentation de certains auteurs :

- sur poules : NOVIKOV, CHEPINOGA et LYUBARSKAYA (1961)  
TOLOKONNIKOVA, MOISEYEVA et BOGATYREVA (1961)  
KUSHNER, TOLOKONNIKOVA, MOISEYEVA, BOGATYREVA  
et SNAMENSKAYA (1961)  
BOGATYREVA, SNAMENSKAYA, KUSHNER, MOISEYEVA  
et TOLOKONNIKOVA (1961)  
SCHOFFNER, BURGER, ROBERTS et LEIGHTON (1962).
- sur souris : KOK (1959); YOON (1964); YOON et SABO (1964).
- sur lapins : TIGYI, BENEDECZKY et LISSAK (1959)  
BEATTY et BILLETT (1961).
- sur rats : PERRY et WALKER (1958); BEARN et KIRBY (1959).
- sur vers à soie : AOUSTAOUROV, BEDNIAKOVA, GUINSBOURG, ZBARSKI  
et RAMENSKAIA (1960).
- sur axolotls : BILLETT, HAMILTON et NEWTH (1964).

Toutefois, KARPFEL, SLOTOVA et PALECK (1963) observent des aberrations chromosomiques chez la souris, après injection de DNA purifié à l'animal.

Chez Drosophila melanogaster, FAHMY et FAHMY (1961, 1962, 1963, 1964, 1965a, 1965b) observent une action "mutagène" lorsque du DNA étranger est injecté dans l'haemocoèle de mâles adultes.

MARTINOVITCH, KANAZIR, KNEZEVITCH et SIMITCH (1961) injectent du DNA polymérisé dans la veine vitelline d'embryons de poulet et les auteurs observent des changements tératologiques dans la descendance, ainsi que des changements dans la couleur du

plumage. Ces mêmes auteurs (1962) observent, outre un changement de couleur du plumage, l'apparition d'un nouveau type d'hémoglobine chez la descendance des animaux traités et, dans toutes ces expériences, l'intervention du DNA injecté paraît vraisemblable.

---

Notons ici qu'au cours des vingt dernières années, plusieurs travaux ont eu pour but de montrer que des injections répétées de sang d'oiseau à d'autres oiseaux de race ou de genre différents produisaient des effets sur la descendance. Comme les globules rouges aviaires sont nucléés, peut-être peut-on rapprocher ces résultats de ceux obtenus lors d'injection de DNA purifié. SOPIKOV (1950, 1954, 1958) obtient, le premier, des modifications de plumage dans la descendance d'animaux injectés avec du sang étranger.

BRATAVOV (1954), GROMOV et FEOKTISTOV (1956, 1958, 1959), GROMOV et POLETSKII (1962), KUSHNER (1956, 1957, 1958), TOLOKONNIKOVA et MOISEYEVA (1958), TOLOKONNIKOVA (1959), PENIONZKEVITCH et MISIN (1959), KUSHNER, TOLOKONNIKOVA et MOISEYEVA (1959), STROUN, STROUN-GUTTIERES, ROSSI-ROESGEN, ROSSI et STROUN (1958a, 1958b, 1962a, 1962b, 1963a, 1963b), SVOBODA (1959), QUATREFAGES et SABATIER (1961), LEROY (1962a, 1962b, 1963), LEROY et BENOIT (1963, 1966) obtiennent des résultats analogues.

Cependant, les résultats observés après injections répétées de sang ne sont pas nécessairement comparables à ceux obtenus lors d'injection de DNA. BENOIT (1957) après injection de DNA observe deux effets, l'un sur les sujets injectés, l'autre sur la descendance, tandis que STROUN, STROUN-GUTTIERES, ROSSI et STROUN (1963a), après injection de sang, signalent que les modifications n'apparaissent pas chez les volatiles injectés, mais à la génération suivante, indépendamment de toute injection. Pour ces derniers auteurs, les modifications enregistrées ont été provoquées par le traitement qui aurait inhibé, dans la descendance, certains mécanismes répressifs et favorisé l'expression de gènes cryptiques.

LEROY, BENOIT, VENDRELY et VENDRELY (1964) injectent un extrait de substances nucléaires d'érythrocytes et observent, dès la première génération, une forte extension des eumélanines du plumage comparable à celle obtenue après injection de sang total, mais avec une intensité et un pourcentage plus élevés.

CILINGARJAN, PAVLOV et MAGAKJAN (1960) ont également obtenu des changements de pigmentation chez le carard Pékin, suite à des injections de noyaux cellulaires d'autres espèces.

PIKU et SUSCHKA (1955, 1956), après injection de sang d'oie à des canards, observent une augmentation significative de la production d'oeufs, mais ne font pas mention de modification de plumage.

KOSIN, KATO et WEISBROTH (1961) et BUSCHINELLI (1962) n'observent aucun effet dans la descendance d'animaux injectés de sang citraté.

Activation métabolique après irradiation

Il y a à peu près une décennie, DETRE et FINCH (1958), LUTSHNIK (1958), PANJEVAC et KANAZIR (1958), KANAZIR, PANJEVAC, CECUK, RISTIC et KRAINCANIC (1958) observaient que des extraits bruts de levure ou de tissus animaux assuraient une certaine protection et amenaient une certaine "restauration" chez des animaux irradiés. Les acides nucléiques isolés de ces extraits se montrent aussi efficaces que les extraits eux-mêmes et pour KANAZIR, BECKAREVIC, PANJEVAC, SIMIC et RISTIC (1959), la restauration observée par les extraits de levure ou de tissus animaux est nulle si ces extraits sont traités par la DNase.

FLOERSHEIM (1962a, 1962b) étudie les effets de cellules de moelle osseuse injectées à des animaux irradiés et obtient des indications sur une action possible des acides nucléiques au niveau cellulaire.

---

Tous les auteurs ne reconnaissent pas au DNA nucléaire des érythrocytes un rôle prépondérant dans les modifications enregistrées lors d'injection de sang total.

KUSHNER, TOLOKONNIKOVA et MOISEYEVA (1959) pensent pouvoir conclure de leurs résultats que le plasma pauvre en DNA est plus actif que la fraction nucléaire riche en DNA.

Les mêmes auteurs (1960) se demandent si les protéines ne pourraient pas jouer un certain rôle.

KUSHNER, TOLOKONNIKOVA, MOISEYEVA, BOGATYREVA et SNAMENSKAYA (1961), n'ayant pas obtenu de résultats avec des injections de DNA purifié, par voie intraveineuse, trouvent ainsi confirmation de leur hypothèse (1959) selon laquelle le DNA n'est pas seul en cause dans les modifications observées après injection de sang non fractionné.

TOLOKONNIKOVA, MOISEYEVA et BOGATYREVA (1961) exposent la même expérience et les mêmes conclusions que les auteurs précédents.

DJORDJEVIC, KOSTIC et KANAZIR (1962) montrent que les cellules L irradiées par U.V. ou rayons X peuvent être "restaurées" si elles sont cultivées en présence de DNA isologue.

HUDNIK-PLEVNIK, GLISIN et SIMIC (1959), SAVKOVIC (1963), MILETIC, PETROVIC et ZALEK (1963) étudient la restauration apportée par des injections de DNA à des rats irradiés.

SCHMIDT, HUBER et CONTELLE (1959), MAISIN, DUMONT et DUNJIC (1960) n'observent pas d'effet thérapeutique.

KARPFEL, PALECEK et SLOTOVA (1962), WILCZOK (1962), étudient le mécanisme et les conditions de restauration, observent une action avec des DNA isologues, homologues et même hétérologues.

LIBINSON, KONSTANTINOVA, MUKSINOVA, POPOVA et ROGACHEVA (1963) notent une stimulation du système hématopoïétique chez des animaux irradiés, aussi bien avec des injections intrapéritonéales qu'intraveineuses de DNA.

POPOVIC, BECAVERIC, KANAZIR, STOSIC et PANTIC (1963) montrent, chez des rats qui ont subi une irradiation à dose létale, qu'après injection de DNA de foie tritié les noyaux des spermatogonies (et non des cellules de Sertoli) sont marqués.

PAOLETTI, REBIERE, AUBIN et TUBIANA (1964) observent une récupération plus rapide du poids et du nombre initial de leucocytes chez des animaux irradiés injectés de DNA que chez les contrôles non traités.

Dans un travail récent, WILCZOK et MENDECKI (1965) étudient l'effet thérapeutique du DNA de différentes sources et de différentes qualités sur des rats ayant subi une irradiation gamma à dose



létale. Les auteurs observent une augmentation significative du nombre de survivants avec toutes les espèces de DNA et l'effet thérapeutique dépend beaucoup plus de la qualité du DNA injecté que de son origine.

### Les acides nucléiques infectieux

Depuis quelques années, de nouveaux problèmes se sont posés en virologie lorsqu'on constata que les acides nucléiques isolés de virus étaient infectieux et qu'ils n'étaient pas affectés par les antisérums qui neutralisent le virus entier (HERRIOTT, 1961 ; HERRIOTT, CONNOLLY et GUPTA, 1961).

LATARJET, REBEYROTTE et MOUSTACCHI (1958) obtiennent la production de cancers multiples chez des souris ayant reçu du DNA extrait de tissus leucémiques isologues ou homologues. Ces cancers ont le caractère des tumeurs provoquées par le virus polyoma qui est très souvent présent en tant que parasite dans les tissus leucémiques (JULIEN, 1962).

DI MAYORCA, EDDY, STEWART, HUNTER, FRIEND et BENDICH (1959) et WEIL (1961) ont montré que le DNA, provenant de cultures de cellules d'embryons de souris infectées par le virus polyoma, était infectieux pour des cellules saines.

ITO (1960) extrait du DNA du papillome de Shope et l'inactive par la chaleur. Il observe que le DNA n'a pas perdu pour autant ses propriétés oncogéniques.

Le pouvoir infectieux du DNA a été mis en évidence, sur animaux ou sur cellules en culture, par de nombreux auteurs expérimentant in vivo ou in vitro (ITO, 1961 ; ITO et EVANS, 1961 ;

DULBECCO et VOGT (1960 ; VOGT et DULBECCO, 1960 ; DULBECCO, 1961 ; ATANASIU, ORTH, REBIERE, BOIRON et PAOLETTI, 1962 ; ORTH, ATANASIU, BOIRON, REBIERE et PAOLETTI, 1964).

BOIRON, PAOLETTI, THOMAS, REBIERE et BERNARD (1962), après avoir montré que le DNA, extrait de cultures cellulaires infectées par le virus SV-40, était infectieux in vitro, ont montré que ce même DNA injecté au hamster nouveau-né reproduit l'effet cancérigène du virus SV-40. (BOIRON, LEVY et THOMAS, 1965). Or, du point de vue physico-chimique, rien ne différencie les acides nucléiques viraux des acides nucléiques normaux.

De nombreuses recherches qui mettent en jeu le DNA extrait de différents tissus néoplasiques ou normaux, ont été effectuées.

STOLK (1961a, 1961b) observe l'apparition d'un carcinome au niveau de l'intestin après injection de DNA de sperme de hareng chez Trito alpestris.

RIVIERE, VENDRELY, CHOUROULINKOV, VENDRELY et GUERIN (1960, 1962) notent l'apparition de leucémies chez des souris qui avaient reçu des préparations de DNA provenant d'un carcinome mammaire ou de tissus normaux de souris.

TOINAI, SCANTLAND et MORGAN (1962) rapportent les propriétés oncogéniques du DNA isolé à partir d'une tumeur d'ascite d'Ehrlich.

Les résultats obtenus par les différents auteurs qui ont étudié le pouvoir oncogénique du DNA extrait de virus ou de tumeur, sont orientés dans le même sens.

Par contre, lors des essais de transformation sur cellules de mammifères ou sur animaux, les résultats sont en sens divers et certaines expériences positives n'ont pu être reproduites.

Devant toutes ces données, quelquefois contradictoires, il nous a paru intéressant d'étudier le devenir d'un DNA exogène hétérologue injecté par voie intraveineuse chez la souris.

Est-il possible à un DNA étranger de parvenir jusqu'aux cellules des divers organes et tissus, sans avoir subi trop de dégradation et d'y être intégré ?

MATERIEL et METHODES

Nous avons utilisé des souris de race BALB/c (obtenues au Chester Beatty Research Institute de Londres) et caractérisées par une fréquence élevée des carcinomes mammaires spontanés.

- Souris impubères : animaux au sevrage, âgés de 21 jours (9 à 12g).
- Souris adultes : mâles et femelles de 3 mois et plus.
- Souris femelles adultes porteuses d'un carcinome mammaire spontané.

1. Produits non-radioactifs

1.1 - Les produits minéraux sont de marque U.C.B., Merck, B.D.H., Fluka, de pureté analytique.

1.2 - Acide désoxyribonucléique (DNA) :

- d'origine animale, préparé à partir de thymus de veau selon la technique de KAY, SIMMONS et DOUNCE (1952) ;

- d'origine bactérienne, préparé à partir de culture de :

E.coli, B.prodigosus, B.subtilis, Agrobacterium tumefaciens, Micrococcus lysodeikticus, selon la technique de MARMUR (1961).

Les produits purifiés obtenus ne contiennent pas de protéines ni d'acide ribonucléique (RNA) en quantité décelable par les méthodes classiques de dosage :

- Pour les protéines : Méthode au Folin-Ciocalteu, selon LOWRY, ROSEBROUGH, FARR et RANDALL (1951).

- Pour le RNA : Méthode à l'orcinol (MEJBAUM, 1939).

La qualité de nos diverses préparations de DNA a été estimée selon les critères suivants :

a) Etude du spectre U.V.

Fig.1 : Spectre caractéristique de nos diverses préparations.

Les rapports caractéristiques du spectre d'absorption du DNA à 260, 230, 280 m $\mu$  sont 1.00, 0.450, 0.515.

b) Viscosité.

Détermination de la viscosité relative dans un viscosimètre à capillaire (selon OSTWALD) d'une solution de DNA contenant environ 500  $\mu$ g/ml dans un tampon citrate 0.1 M, pH 7.4 contre la viscosité du tampon seul à 25°C. (+)

c) Stabilité à la chaleur.

Le DNA en solution dans un tampon citrate 0.1 M, pH 7.4, à la concentration d'environ 500  $\mu$ g/ml est chauffé à 76°C pendant 1 heure.

La viscosité spécifique  $\left( \frac{\eta_a - \eta_0}{\eta_0} \right)$  après refroidissement n'a jamais différé de plus de 2 % de la viscosité spécifique de cette même solution avant chauffage.

d) Dénaturation thermique.

L'effet hyperchrome après chauffage du DNA en solution à 100°C pendant 10 minutes et ensuite refroidissement rapide au bain de glace a toujours été égal ou supérieur à 35 % (MARMUR et DOTY, 1959).

e) Détermination du poids moléculaire.

Le P.M. est estimé à partir de la constante de sédimentation mesurée par ultracentrifugation dans un ultracentrifugeur Spinco analytique E.

---

(+) Dans ces conditions, la viscosité relative est d'environ 3.

1.3 - Duponol : Sodium dodécyl sulfate : purifié et recristallisé selon CRESTFIELD (1955).

## 2. Produits radioactifs

2.1 - Thymine-<sup>3</sup>H C.E.N. Activité spécifique 3 Ci/mM

2.2 - Thymidine-<sup>3</sup>H C.E.N. Activité spécifique 3 à 17 Ci/mM

2.3 - Toluène-<sup>3</sup>H C.E.N. Activité spécifique 6 µCi/ml  
(sert en étalonnage interne pour l'estimation du rendement des comptages).

2.4 - DNA tritié de E.coli, obtenu par synthèse biologique.

Préparé à partir d'une souche de E.coli (C R 34)<sup>(+)</sup> auxotrophe pour la thymine (FRASER et JERREL, 1953).

Le DNA extrait à partir des bactéries cultivées en présence de thymine-<sup>3</sup>H, a la radioactivité spécifique du précurseur radioactif. Le plus souvent nous préparons du DNA ayant une activité spécifique de 1.5 Ci/mM soit environ  $2.5 \times 10^6$  dpm/microgramme.

2.5 - DNA de B.subtilis tritié et deutéré

Le Dr. M. SROGL<sup>(++)</sup>, de passage dans notre laboratoire, a adapté la souche de B.subtilis S M Y W type Harburg prototrophe (Dr. Schaeffer) à l'eau lourde et l'a cultivée en présence de thymidine-<sup>3</sup>H (BODNER et SCHILKRAUT, 1964).

2.6 - DNA de E.coli tritié et deutéré

Nous avons adapté la souche CR 34 Thy<sup>-</sup>F<sup>-</sup> de E.coli sur eau lourde en suivant la technique décrite par MARMUR et SCHILKRAUT (1961).

---

(+) Nous devons cette souche au Prof. R.H. Hofschneider du Max-Planck Institut für Biochemie de Munich, que nous remercions vivement.

(++) de l'Institut de Microbiologie de l'Académie des Sciences, à Prague.

Les bactéries prélevées à une culture normale sont repiquées successivement sur des milieux de concentration croissante en  $D_2O$ . Finalement, la souche est cultivée sur eau lourde pure (min. 99 %  $D_2O$ ).

Pour préparer les milieux de culture, tous les constituants sont soigneusement déshydratés avant leur mise en solution dans l'eau lourde.

Le DNA est conservé, soit en fibres, soit en solution saline citratée (0.015 M NaCl + 0.0015 M citrate trisodique) à la concentration d'environ 1 mg/ml.

	P.M.	Activité spécifique	Densité g/ml
E.coli	8 à 15 x 10 <sup>6</sup>		1,710
E.coli- <sup>3</sup> H	8 à 15 x 10 <sup>6</sup>	2,5 x 10 <sup>6</sup> dpm/μg	1,710
E.coli- <sup>3</sup> H + D <sub>2</sub> O	8 à 15 x 10 <sup>6</sup>	2 x 10 <sup>6</sup> dpm/μg	1,736
B.subtilis- <sup>3</sup> H + D <sub>2</sub> O	8 x 10 <sup>6</sup>	50 à 200 x 10 <sup>3</sup> dmp/μg	1,728
M.lysodeikticus	9 à 17 x 10 <sup>6</sup>		1,731
Clostridium perfringens	5 x 10 <sup>6</sup>		1,691

Nous avons soumis à l'ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium (selon MESELSON, STAHL et VINOGRAD, 1957) des échantillons de nos différentes préparations de DNA.

Fig.2 - Du DNA tritié et deutéré de B.subtilis et du DNA tritié de E.coli ont été centrifugés en présence de DNA de thymus de veau et de DNA de M.lysodeikticus, non radioactifs, ajoutés comme référence.

Les densités des DNA radioactifs sont en accord avec MARMUR et SCHILKRAUT (1961) et BODNER et SCHILKRAUT (1964).

Fig.3 - Du DNA tritié et deutéré de E.coli a été centrifugé en présence de DNA de Clostridium perfringens et de DNA de M.lysodeikticus, ajoutés comme référence.

La densité du DNA-<sup>3</sup>H et D<sub>2</sub>O de E.coli est en accord avec MARMUR et SCHILKRAUT (1961).



### 3. Manipulation des animaux

L'hyperplasie des organes génitaux femelles est obtenue par l'injection de 10 microgrammes de benzoate d'oestradiol<sup>(+)</sup>, en solution dans l'huile officinale, par voie sous-cutanée ventrale, à des animaux âgés de 21 jours (9 à 12 g.).

Le sang est prélevé, soit par ponction cardiaque après légère anesthésie à l'éther, soit par prélèvement - pour les petites quantités - à l'aide d'un capillaire dans le sinus caverneux retro-orbital (LA PEYRAC, 1963).

L'animal est sacrifié par dislocation cervicale. Les organes sont immédiatement disséqués, lavés et perfusés par de l'eau physiologique, pesés et ensuite congelés sur carboglace.

### 4. Séparation chimique des acides nucléiques

Procédé de SCHMIDT-THANNHAUSER qui permet de séparer les acides ribo- et désoxyribonucléiques (SCHMIDT et THANNHAUSER, 1945 ; HUTCHINSON et MUNRO, 1961 ; MUNRO et FLECK, 1966).

Un volume d'homogénat refroidi, correspondant à 100 mg de tissu, est additionné d'un volume égal de P.C.A. 10 % froid. L'extraction est effectuée pendant 30 minutes au bain de glace à 0°C. Les acides nucléiques et les protéines précipitent. Après centrifugation, le surnageant est décanté et le culot est lavé 2 fois par un volume de P.C.A. 5 % froid.

Les surnageants sont réunis et constituent la fraction acido-soluble.

---

(+) Gracieusement mis à notre disposition par les firmes Schering et Organon.

Si les surnageants sont troubles, on ajuste à pH 5 et on déprotéinise en agitant avec du chloroforme selon SEVAG, LACKMAN et SMOLENS (1938).

Le culot de centrifugation est traité successivement à température ambiante par : alcool 94 %, alcool-éther (3 : 1), éther-alcool (3 : 1) et éther.

Après chaque extraction, le culot est soigneusement agité et mis en suspension dans le solvant suivant.

Le culot sec délipidé est digéré dans 5 ml de KOH 0.3 N pendant 1 heure à 37°C.

Ces conditions de digestion sont suffisantes pour extraire tout le RNA sous forme de composants acido-solubles tandis que, dans ces conditions, peu de protéines sont solubilisées et le contenu en RNA peut être, sans difficulté, déterminé par spectrophotométrie?

Après la digestion alcaline, l'extrait est refroidi au bain de glace et, toujours à froid, neutralisé par du P.C.A. concentré. Après neutralisation, on ajoute du P.C.A. à 70 % froid jusqu'à concentration finale de 2,5 %.

Après centrifugation, le surnageant est séparé et le culot est lavé deux fois par 5 ml de P.C.A. 5 % froid.

Les surnageants sont réunis et constituent la "fraction RNA". Le résidu est traité par 2 ml de P.C.A. 5 % pendant 20 minutes à 70°C. La solution est ensuite centrifugée et le surnageant est décanté. Le culot est réextrait une seconde fois à chaud par 1 ml de P.C.A. 5 %. Après centrifugation à 3000 tpm pendant 5 minutes et séparation du surnageant, le culot est lavé par 1 ml de P.C.A. 5 % à température ambiante.

Les surnageants sont réunis et constituent la "fraction DNA".

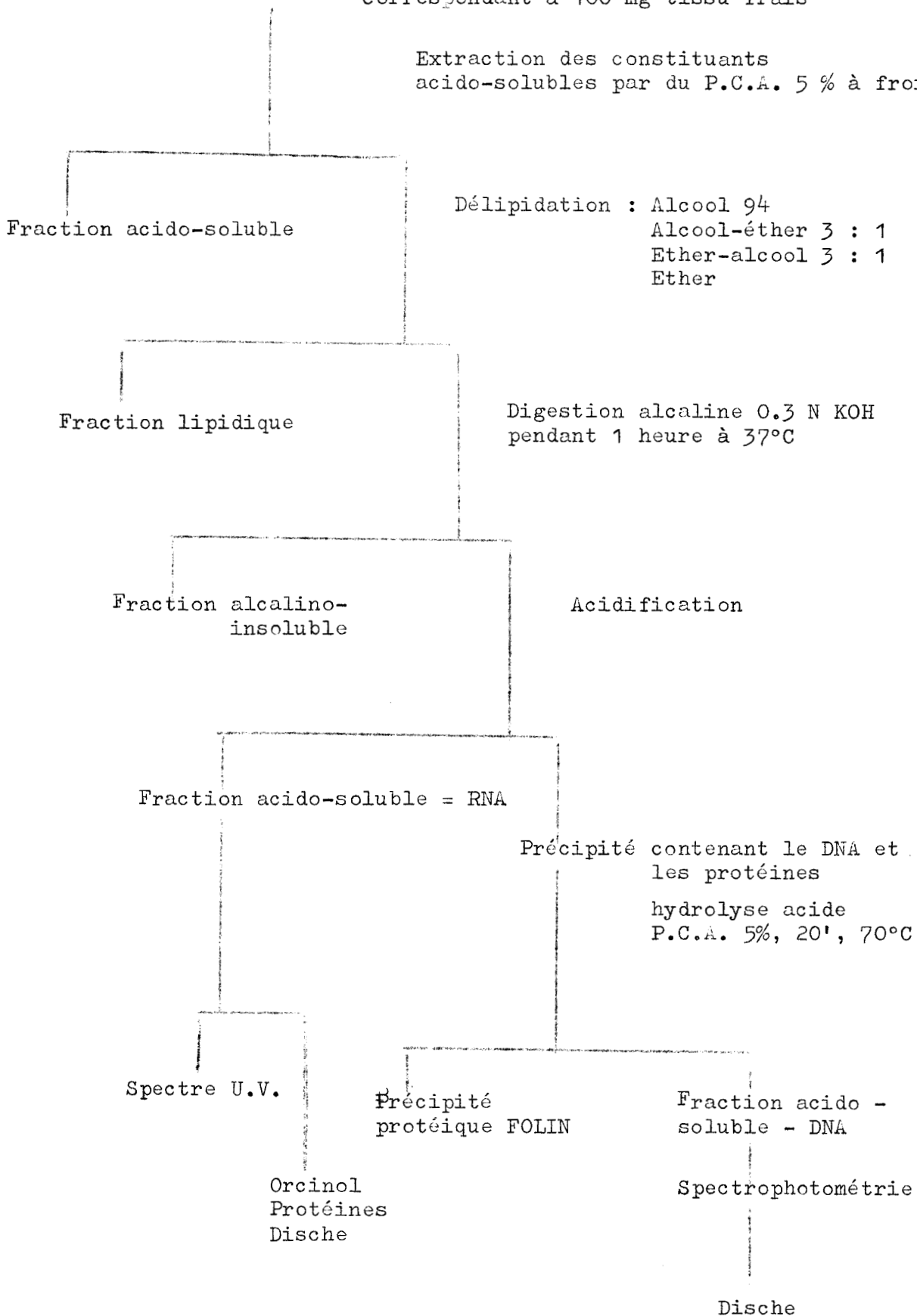
Le culot est composé presque uniquement de protéines qui peuvent être dosées après digestion alcaline : FOLIN (LOWRY, ROSEBROUGH, FARR et RANDALL, 1951).

Comme les divers traitements (digestion alcaline, hydrolyse acide à chaud) dénaturent certaines protéines en les rendant partiellement acido-solubles, lorsqu'une estimation plus exacte est nécessaire, le dosage est effectué sur une aliquote, après la digestion alcaline du RNA.

HOMOGENAT

correspondant à 100 mg tissu frais

Extraction des constituants  
acido-solubles par du P.C.A. 5 % à froid



## 5. Chromatographie des acides nucléiques

### 5.1- Préparation de la résine.

Les feuilles de papier de DEAE-cellulose (Whatman DE 20) sont dilacérées au mixer dans de l'eau distillée. La pulpe de papier est ensuite traitée par du NaOH N et filtrée sur filtre Buchner jusqu'à ce que l'éluat soit incolore (on élimine ainsi une substance soluble, jaunâtre, en solution qui absorbe dans l'U.V.).

La pulpe est ensuite lavée abondamment à l'eau distillée jusqu'à ce que l'éluat ait le pH de l'eau distillée. La pulpe est essorée par succion. Elle est ensuite traitée par un tampon phosphate 0.01 M, pH 7, jusqu'à ce que le filtrat ait le même pH que la solution de lavage.

La pulpe ainsi traitée est ensuite séchée à l'étuve à 60°C.

### 5.2- Préparation des homogénats.

Les organes sont homogénéisés à l'Ultra-Turrax dans une solution saline d'EDTA (NaCl 0.15 M + EDTA 0.10 M) ajustée à pH 8 à raison de 40 ml de solution par g. de tissu<sup>(+)</sup>.

En général, une homogénéisation de 10 secondes à 20.000 t/min est suffisante pour obtenir une suspension homogène. A une aliquote de la suspension on ajoute la solution de sodium lauryl sulfate (en solution concentrée à 20 %) jusqu'à une concentration finale de 1 %. C'est à cette concentration que nous avons obtenu le meilleur rendement, en accord avec les résultats obtenus par HAREL, HAREL, BOER, IMBENOTTE et CARPENI (1964).

---

(+) Quelquefois, la dilution 1/40 n'est pas suffisante, la viscosité après addition de Duponol est trop élevée, ce qui empêche une bonne déprotéinisation (c'est le cas pour la moelle, le thymus, les globules rouges aviaires). Dans ce cas, on fait une dilution à 1/80 ou 1/60.

L'action du détergent se manifeste par une augmentation immédiate de la viscosité.

L'échantillon est agité pendant 10 minutes en présence d'un volume égal de phénol redistillé et saturé de saline-EDTA.

Après centrifugation à 3000 tpm pendant 10 minutes, le surnageant est récupéré et la galette protéique, ainsi que le phénol sont réextraits par un même volume de la solution saline-EDTA.

Après agitation et centrifugation, le surnageant est récupéré et ajouté au précédent.

### 5.3- Méthode

0.2 g. de pulpe de papier de DEAE-cellulose traité et séché est placé dans un petit tube à centrifuger en polythène dont le fond a été percé d'une dizaine de trous et qui surmonte un récipient adéquat (cf. Photo 1).

Le papier est humidifié par le tampon phosphate 0.01 M, pH 7. Il est réparti uniformément dans le fond du tube à l'aide d'une spatule. On enlève l'excès de tampon par centrifugation pendant quelques minutes à 500 tpm.

Cette quantité de résine est suffisante pour adsorber les acides nucléiques provenant de 50 mg de tissus frais<sup>(+)</sup>.

Les extraits de tissus déprotéinisés sont placés dans les tubes qui contiennent la pulpe de papier. Ils sont centrifugés à 500 tpm pendant 3 à 5 minutes.

Le premier filtrat contient le matériel "non adsorbé". Des volumes adéquats des divers éluants sont ensuite utilisés successivement.

---

(+) 200 mg de papier sont saturés par 1 mg environ de DNA purifié.

Chaque fraction est récoltée séparément.

Chaque éluant est employé plusieurs fois de manière à bien désorber la fraction et d'éviter la contamination des fractions suivantes.

Après chromatographie, la pulpe est mise à digérer dans une solution d'acide chlorhydrique concentré ( $d = 1.19$ ) contenant 5% de chlorure de zinc et chauffée à  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 30 à 60 minutes.

#### Eluants pour chromatographie

Tampon phosphate Soerensen 0.01 M ( $\text{K H}_2 \text{PO}_4 - \text{Na}_2 \text{H PO}_4$ )

Eluants : 1 = tampon phosphate 0.01 M pH 7

2 = tampon phosphate 0.01 M pH 7 + NaCl 0.14 M

3 = tampon phosphate 0.01 M pH 7 + NaCl 0.50 M

4 = tampon phosphate 0.01 M pH 7 + NaCl 1.00 M

5 = 0.20 M  $\text{NH}_3$  + NaCl 2.0 M

6 = Na OH 1 N

## 6. Estimation de la radioactivité

### 6.1 - Sur les homogénats totaux.

Une aliquote des échantillons est digérée dans 1 ml d'une solution M/2 d'hyamine base (OH) dissoute dans du méthanol.

Il est parfois nécessaire de chauffer le mélange à  $60^{\circ}\text{C}$  pour faciliter la digestion. Lorsque celle-ci est complète, on ajoute 15 ml du mélange scintillant<sup>(+)</sup> et on estime la radioactivité au compteur à scintillation liquide PACKARD.

### 6.2 - Sur les éluants de chromatographie.

A 2 ml de l'éluant, on ajoute 15 ml du milieu scintillant<sup>(+)</sup>

---

(+) Dioxane, 600 ml ; Ethylène glycol, 250 ml ; Alcool éthylique, 150 ml  
Naphtalène, 60 g ; P.P.O., 7 g ; POPOP, 250 mg (Mélange DAV.)

additionné de 6 % en volume de la solution M/2 d'hyamine. On estime la radioactivité au compteur à scintillation liquide PACKARD.

## 7. Dosage des acides nucléiques

### 7.1 - Par spectrophotométrie dans l'ultra-violet.

On sait que les acides nucléiques doivent à leurs bases azotées une forte bande d'adsorption dans l'ultra-violet et que l'absorption U.V. d'une solution d'acide nucléique polymérisé est nettement inférieure à celle de cette même solution après hydrolyse.

Il faut noter, en outre, que le maximum d'absorption se situe à des longueurs d'ondes ( $\lambda$ ) différentes suivant qu'il s'agit d'une solution d'acide nucléique polymérisé ou d'une solution d'acide nucléique hydrolysé.

Dans le premier cas, la  $\lambda$  maximum se situe à 258  $\mu$  ; dans le second cas, à 267  $\mu$  (+).

Le facteur par lequel il faut multiplier la valeur de l'absorption maximum pour pouvoir estimer la concentration sera donc différent suivant qu'il s'agit d'une solution d'acide nucléique polymérisé ou hydrolysé.

---

(+) Les traitements qui entraînent des modifications de l'hétérocycle azoté modifient également, d'une manière plus ou moins importante, le spectre U.V. Outre l'hydrolyse enzymatique, l'hydrolyse acide - la dénaturation thermique - la dénaturation par dilution et la dénaturation par modification du pH, entraînent un déplacement de la longueur d'onde du maximum d'absorption et une augmentation de celle-ci.



Rappelons que les conditions pour la conservation de l'intégrité du DNA en solution sont :

$4 < \text{pH} < 11$

Concentration saline :  $10^{-2}$  M pour les cations monovalents

$10^{-3}$  M pour les cations bivalents

$0^\circ < \text{température} < 60^\circ$

Concentration : 0.2 à 1,0 mg/ml

Stérilité du solvant.

## 7.2 - Par colorimétrie du sucre constitutif

Les procédés colorimétriques sont plus ou moins spécifiques des pentoses ou des désoxypentoses.

### 7.2.1- Dosage du RNA

Le dosage dépend de la libération du furfurol par action de l'acide chlorhydrique à chaud.

On dose ainsi le pentose aux bases puriques du RNA (MEJBAUM, 1939 ; DE DEKEN-GRENSON et DE DEKEN, 1959).

La solution utilisée contient 100 mg de  $\text{Fe Cl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  dans 100 ml HCl conc. ( $d = 1.19$ ) additionné de 3.5 ml d'une solution à 6 % d'orcinol dans l'éthanol.

Un volume de la solution de RNA est additionné de 2 volumes de réactif. On chauffe le mélange au bain-marie bouillant pendant 30 minutes.

La courbe d'étalonnage est préparée à l'aide de solutions de RNA de concentrations connues.

On lit la densité optique à 665 m $\mu$ .

### 7.2.2- Dosage du DNA

Le DNA chauffé avec la diphénylamine en solution acide prend une coloration bleue. Ici aussi, c'est plutôt le sucre localisé dans les nucléotides puriques qui réagit.

Le dosage est effectué selon la méthode décrite par DISCHE (1930) ou mieux, par la technique plus sensible décrite par BURTON (1958).

Pour ce faire, on dissout 225 g de diphénylamine p.a. dans 150 ml d'acide acétique glacial. On ajoute 2.25 ml d'acide sulfurique concentré p.a. et ensuite 1.12 ml d'une solution contenant 16 mg/ml d'acétaldéhyde.

Un volume de la solution de DNA est additionné de 2 volumes de réactif. On agite et on laisse développer la coloration pendant 24 heures dans l'obscurité et à température ambiante. La courbe d'étalonnage est obtenue à l'aide de solutions de DNA de concentrations connues. On lit la densité optique à 600 m $\mu$ .

### 8. Dosage des protéines

Nous avons utilisé la méthode décrite par LOWRY, ROSEBROUGH, FARR et RANDALL (1951). Cette méthode repose sur la réaction du biuret des protéines avec les ions Cu en solution alcaline et sur la réaction du réactif phosphomolybdo-phosphotungstique avec la tyrosine et le tryptophane.

On mélange 50 ml d'une solution de Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> à 2 % dans Na OH 0.1 N avec 1 ml d'une solution contenant du Cu SO<sub>4</sub> à 5 % et du tartrate sodico-potassique à 1 %.

Le réactif de Folin (U.C.B. ou Merck) est dilué par un même volume d'eau.

A 1 volume de la solution de protéines, on ajoute 5 volumes de la solution alcaline. Dix minutes après, on ajoute 1/2 volume du réactif de Folin. On agite rapidement et vigoureusement.

Après 30 minutes, on mesure la densité optique à 750 m $\mu$ .

La courbe d'étalonnage est obtenue à l'aide de solutions de ribonucléase ou de lysozyme de concentrations connues.

Lorsque les protéines sont insolubles, on les dissout (éventuellement à chaud) à l'aide de Na OH N.

Rappelons que les substances qui réagissent avec le réactif de Folin sont :

- le tryptophane et la tyrosine,
  - les phénols (sauf le nitrophénol), l'acide urique, la guanine, la xanthine,
- et que différentes substances provoquent des traces de coloration.

## 9. Viscosité

Se mesure dans un viscosimètre à capillaire selon OSTWALD plongé dans un bain-marie à 25°C.

Le DNA est mis en solution à la concentration de 250 à 500  $\mu$ g/ml dans une solution saline citratée à pH 7.0 (0.015 M NaCl - 0.0015 M citrate trisodique) ou dans un tampon citrate 0.1 M pH 7.4 ou encore dans un tampon EDTA 0.1 M pH 7.5.

Le viscosimètre est placé dans un thermostat à 25°C; on introduit 2 ml du solvant dans la partie large du viscosimètre. Lorsque la **température** est équilibrée, la solution est aspirée

à travers la partie capillaire du viscosimètre jusqu'au dessus du second trait. On laisse la solution s'écouler librement et on chronomètre le temps qui s'écoule entre le passage du ménisque au premier et au second trait. Le solvant est retiré, le viscosimètre est lavé et séché à l'aide d'acétone et les opérations sont répétées avec la solution de DNA.

Si  $\eta_c$  = temps d'écoulement pour l'échantillon,

$\eta_o$  = temps d'écoulement pour le solvant,

la viscosité relative<sup>(+)</sup> ( $\eta_{rel}$ ) est égale au rapport des temps d'écoulement de l'échantillon et du solvant =  $\frac{\eta_c}{\eta_o}$

La viscosité spécifique ( $\eta_{sp}$ ) est égale à ( $\eta_{rel} - 1$ ) ou  $\frac{\eta_c - \eta_o}{\eta_o}$

#### 10. Autoradiographie

Méthode qui permet de détecter les émissions radioactives et de les localiser dans l'espace de quelques microns. Les émissions radioactives impressionnent les grains d'argent de l'émulsion le long de leur trajectoire et y créent une image latente.

Après fixation dans le réactif de CLARKE (1851) - alcool/acide acétique glacial (3 : 1) - pendant 1 heure, les pièces anatomiques sont déshydratées et enrobées dans la paraffine (PELC, 1956).

Les pièces sont coupées au microtome en tranches de 4  $\mu$ . Les coupes sont montées sur des lames porte-objet prétraitées à l'albumine glycérolisée ou à la gélatine (FICQ, 1959).

---

(+) Relation entre la viscosité relative et le poids moléculaire (P.M.) (EIGNER et DOTY, 1965) :

- pour les P.M. inférieurs à  $2 \cdot 10^6$  :  $(\eta) = 1,05 \times 10^{-7} M^{1.32}$
- pour les P.M. supérieurs à  $2 \cdot 10^6$  jusqu'à  $130 \cdot 10^6$  :  $(\eta) = 6.9 \times 10^{-4} M^{0.70}$

Nous avons utilisé l'émulsion Ilford in gel form L 4 et la méthode par plongée "dipping" (FICQ, 1959).

Les préparations déparaffinées et réhydratées sont, encore humides, plongées dans l'émulsion diluée. Elles sont égouttées, séchées et conservées à 4°C en boîtes étanches à la lumière.

La nature des substances qui portent la radioactivité a été vérifiée à l'aide de différents tests :

#### 10.1- Test à l'acide perchlorique.

Il sert à éliminer la radioactivité portée par des constituants acido-solubles. Les lames humides, après déparaffinage et réhydratation, sont plongées dans une solution de P.C.A. à 5 % (0.8 N) glacée, pendant 20 à 30 minutes. Les lames sont ensuite lavées à l'eau courante pendant 60 minutes et l'émulsion y est apposée.

#### 10.2- Test à la désoxyribonucléase.

Le test enlève la radioactivité portée par le DNA (LEDUC, 1961). La solution de DNase utilisée contient 0.1 mg/ml d'enzyme dans une solution de  $Mg Cl_2$  0.02 M ajustée à pH 7.4

Les préparations sont recouvertes par la solution de DNase. Elles sont placées à 37°C pendant 1 heure. Elles sont ensuite plongées pendant 30 minutes dans une solution glacée de P.C.A. à 2 % pour enlever les produits de digestion acido-solubles. Ensuite, elles sont lavées à l'eau courante pendant 60 minutes.

#### 10.3- Test à la ribonucléase (BRACHET, 1953)

L'hydrolyse du RNA est provoquée par une solution à 0.1 mg/ml de ribonucléase dans de l'eau distillée ajustée à pH 6 (cette solution est chauffée à 80°C pendant 10 minutes pour inactiver la DNase et les protéases qui pourraient contaminer la solution).

Les préparations sont couvertes par la solution de RNase et placées à l'étuve à 37°C pendant 1 à 2 heures.

Après la digestion enzymatique, les lames sont plongées dans une solution glacée de P.C.A. à 2 % pendant 30 minutes pour enlever les produits de digestion acido-solubles. Elles sont ensuite lavées à l'eau courante pendant 60 minutes.

Les préparations ont été colorées à l'hématoxyline HARRIS et différenciées à l'érythrosine.

#### 11. Centrifugation en gradient de densité (chlorure de césium)

On sait que cette méthode permet la séparation des DNA de densités différentes (MESELSON, STAHL et VINOGRAD, 1957). Elle repose sur le principe que dans un gradient de densité, les molécules de DNA se placent en fonction de leur densité propre, en équilibre avec la densité locale du gradient.

Le gradient est formé de chlorure de césium et est obtenu par centrifugation à la température ambiante à 27.000 tpm pendant 62 heures.

##### 11.1- Préparation des échantillons de tissus animaux

De nombreuses méthodes d'extraction du DNA à partir d'organes animaux ont été proposées ; elles ont toutes un point commun, leur faible rendement.

Nous devons chercher à obtenir le rendement maximum, car nos échantillons doivent être représentatifs quantitativement et qualitativement de ce qui existe dans les organes ou tissus.

Nous avons été amené à rechercher une méthode d'extraction et de purification suffisamment douce pour préserver au maximum les structures, suffisamment sélective pour obtenir des échantillons propres sans contaminants importants.

Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec la méthode qui comprend les étapes suivantes :

- Le tissu est homogénéisé à l'Ultra-Turrax pendant 10 secondes dans une solution contenant NaCl 0.15 M + EDTA 0.1 M et ajustée à pH 8 (pour 1 g de tissu nous employons 40 ml de solution).
- On ajoute du sodium dodécyl sulfate (SDS) pour obtenir une concentration finale de 1 % et ensuite 2 mg/ml de pronase (Calbiochem grade B)<sup>(+)</sup>. Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 heures.
- Les acides nucléiques sont précipités à l'aide d'alcool (concentration finale 66 %).  
Dans ces conditions de précipitation, la pronase est toujours soluble et est, de ce fait, éliminée (Fig.4).
- Le précipité est remis en solution dans le mélange NaCl - EDTA - SDS et après avoir ajouté de la ribonucléase (50 µg/ml) on incube à 37°C pendant 1 heure.
- On ajoute ensuite 2 mg de pronase par ml de solution et on incube à 37°C pendant 2 heures.
- Le DNA est précipité à l'aide d'alcool (concentration finale 66 %). Le précipité est lavé plusieurs fois avec de l'alcool 70 % et remis en solution dans NaCl 0.15 M - citrate trisodique 0.015 M pH 7.9.

---

(+) La solution de pronase est incubée pendant quelques heures à 37°C pour provoquer une autodigestion des nucléases contaminant la préparation.

### 11.2- Centrifugation

A 3 ml de cette solution contenant environ 75 microgrammes de DNA, on ajoute 3.75 g de chlorure de césium p.a. Après dissolution du CsCl, on centrifuge - s'il y a lieu - pour enlever les protéines dénaturées qui forment une couche surnageante. Trois ml de la solution sont placés dans un tube en nitrate de cellulose et 25 à 30 µg de DNA de référence (densité connue) sont ajoutés.

Le tube contenant la solution à ultracentrifuger est placé dans un rotor à godets basculants (SW 39) et il est centrifugé à 27.000 tpm pendant 62 heures dans un ultracentrifugeur Spinco préparatif L4.

### 11.3- Fractionnement

Après centrifugation, le tube est placé dans le dispositif indiqué sur la photo 2.

Le tube étant solidement maintenu, le fond est percé à l'aide d'une aiguille à biseau court N° 18.

En injectant de l'huile de silicone à l'aide d'une seringue dont le piston est solidaire d'une vis micrométrique, on provoque l'écoulement des gouttes sous pression constante et à vitesse contrôlée.

Les gouttes sont recueillies dans des fioles disposées en spirale sur un plateau ; le bras qui porte le tube est solidaire du plateau et se déplace en suivant la spirale.

Les 3 ml de solution sont fractionnés à raison de 2 gouttes par fiole. Avec les tissus animaux, on obtient 110 fractions environ.



Après avoir ajouté 1 ml d'eau aux fioles, on détermine le spectre d'absorption dans l'U.V. à l'aide d'un "Beckman DK1 recording spectrometer".

Pour estimer la densité des molécules radioactives, nous ajoutons des références de densité, ce qui nous permet de déterminer les propriétés du gradient.

A environ 60 µg de DNA à analyser, nous ajoutons 30 µg de DNA purifié de M.lysodeikticus.

Par la technique de préparation des échantillons décrite ci-dessus, nous obtenons des DNA suffisamment purifiés pour que, par spectrophotométrie dans l'U.V., la position du DNA endogène et celle du DNA de référence puissent être déterminées avec précision (Fig.5). De cette façon, deux points du gradient sont connus et l'estimation de la densité des molécules inconnues peut se faire par interpolation (Fig.8).

La radioactivité des solutions est ensuite estimée après hydrolyse acide à chaud. Nous ajoutons 0.1 ml d'HCl concentré aux fioles qui sont ensuite chauffées à 70°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, on ajoute 15 ml de milieu scintillant<sup>(+)</sup> et la radioactivité est estimée au compteur à scintillation liquide Packard.

En portant en ordonnée la valeur de l'absorption ultraviolette ou celle de la radioactivité et en abscisse le numéro d'ordre de la fraction, on obtient des diagrammes où les différentes valeurs dessinent des courbes qui sont symétriques si la centrifugation a été suffisante et si la quantité de DNA a été convenable (Fig.6 et 7).

---

(+) Naphtalène, 100 g ; PPO, 10 g ; POPOP, 250 mg ; alcool éthylique, 200 ml ; dioxane, 1000 ml (Mélange DDV).

En vue d'éprouver la méthode de préparation, nous avons ajouté à un homogénat d'organe 10 µg de DNA-<sup>3</sup>H, D<sub>2</sub>O de B.subtilis et nous avons estimé la radioactivité retrouvée après toutes les manipulations d'extraction.

Nous avons, en outre, ajouté à une solution fraîchement préparée de DNA d'organe, la même quantité (10 µg) de DNA-<sup>3</sup>H, D<sub>2</sub>O de B.subtilis.

Les deux échantillons ont été soumis à l'ultracentrifugation. La Fig.9 nous montre les diagrammes obtenus.

Lors des manipulations d'extraction, nous avons perdu environ 10 % de la radioactivité.

Sur la Fig.9, nous pouvons aussi voir que le DNA radioactif a été légèrement dépolymérisé par les manipulations. La base de la courbe est plus large<sup>(+)</sup>.

Les écarts-type de la distribution, qui sont caractéristiques de la grandeur moléculaire sont, dans le cas du DNA ajouté après préparation des échantillons, égaux à 13 % pour 18 % dans le cas du DNA ajouté avant les manipulations d'extraction. Ce qui signifierait une diminution du poids moléculaire d'environ 10 %.

---

(+) Plus la masse d'une particule est grande, moins vite elle diffuse, ce qui permet de prévoir que la largeur de la bande est une fonction de la masse moléculaire de cette particule (ELIAS, 1961).

ETUDE PAR CHROMATOGRAPHIE DE MODIFICATIONS PROVOQUEES DU DNA

---

Par notre méthode de chromatographie<sup>(+)</sup>, basée sur l'élu-tion différentielle de molécules de P.M. différents, nous avons étudié la dénaturation thermique et l'hydrolyse enzymatique, deux phénomènes particulièrement intéressants pour l'interprétation de résultats bio-logiques obtenus in vivo ou in vitro.

On sait que la DNase neutre pancréatique agit au niveau des liaisons 5'phosphate. Le DNA est ainsi dépolymérisé et hydrolysé en di-, tri- et poly-5'-nucléotides.

La chaleur agit sur les liaisons hydrogène reliant les deux chaînes de DNA et on obtient, après chauffage, un DNA monocaténaire.

Dans ces expériences, nous avons utilisé du DNA de thymus de veau préparé suivant la méthode de KAY (1952).

La concentration en nucléotides des différentes fractions de DNA a été estimée à partir du spectre U.V. enregistré sur un spec-trophotomètre Beckman DK1. La différence entre la valeur du spectre à 260 m $\mu$  et celle à 300 m $\mu$  nous donne une mesure de la concentration.

1. Cinétique de l'action de la DNase<sup>(++)</sup>

Le graphique 10 montre les résultats de l'action de diffé- rentes quantités de DNase (0.01, 0.025, 0.100 et 0.400  $\mu$ g) sur une même quantité de DNA (540  $\mu$ g de DNA de thymus de veau).

Les conditions de chromatographie centrifugée sont les mêmes dans les quatre expériences.

---

(+) DAVILA, CHARLES et LEDOUX (1965a, 1965b).

(++) Les résultats de ces expériences ont fait l'objet d'une note préliminaire en collaboration avec LEDOUX (1963).

Le DNA est incubé avec la DNase en présence de  $MgCl_2$  ( $5 \cdot 10^{-3} M$ ) dans un tampon phosphate 0.01 M (pH 7.8) à 37°C. Après 0, 20, 40 et 60 minutes, une aliquote est prélevée et on y ajoute un mélange froid de sodium dodécyl sulfate (SDS) et de versène (concentration finale 2.5 % SDS - 0.15 M EDTA).

Après homogénéisation, le mélange est adsorbé sur la pulpe de papier qui est immédiatement centrifugée.

Les résultats montrent qu'aux faibles concentrations en enzyme, seules les fractions les plus polymérisées subissent l'action de la DNase.

Ainsi, avec la plus faible concentration en enzyme (Graphique 10/1) la fraction 6 diminue et la 5 augmente. A une concentration plus élevée en enzyme, la fraction 6 diminue plus fortement, tandis que la 5 passe par un maximum. Si la concentration est encore plus élevée, les fractions 5 et 6 diminuent immédiatement, tandis que la 4 passe par un maximum, etc... (Graphique 10/3).

Cette cinétique nous montre l'interrelation existant entre les différentes fractions éluées sur papier de DEAE-cellulose. A côté des modifications enregistrées dans le diagramme d'éluion, nous avons également indiqué les changements de la viscosité mesurée dans un micro-viscosimètre d'OSWALD (Graphiques 10/1,2,3).

On peut voir que la chute de viscosité suit exactement la diminution en concentration de la fraction 6. Plus la diminution est rapide, plus la chute de viscosité est importante. Une faible modification du P.M. se traduit immédiatement par une diminution de la fraction 6 et par une chute de la viscosité.

On peut aussi se rendre compte, sur les graphiques, qu'aux concentrations en enzymes étudiées, il n'y a pas apparition de fraction acido-soluble (1 et 2).

## 2. Cinétique de la dénaturation thermique

Nous avons vu en étudiant par chromatographie des DNA d'origines différentes (bactériens, animaux, végétaux), que les fractions qui sont les plus importantes pour la caractérisation des DNA, sont les fractions obtenues avec les éluants alcalins<sup>(+)</sup>.

Pour cette raison, nous avons essayé d'augmenter la résolution du fractionnement en recherchant de nouveaux éluants capables de séparer les molécules désorbées en milieu alcalin.

En nous basant sur le schéma expérimental de BENDICH, FRESCO, ROSENKRANZ et BELSER (1955), nous avons retenu 12 éluants qui sont capables de séparer des fractions bien distinctes.

Nous avons appliqué la technique ainsi modifiée, à l'étude de la dénaturation thermique et de la cinétique de la dénaturation à différentes températures.

Le Graphique 11 montre la courbe de dénaturation du DNA de thymus de veau utilisé. Cette courbe (ainsi que les résultats qui suivent) ont été obtenus dans les conditions expérimentales décrites par MARMUR et DOTY (1959) :

- 20 µg de DNA/ml en solution saline citratée (0.15 M NaCl + 0.015 M citrate trisodique).

La cinétique de dénaturation a été étudiée à 67, 72, 87 et 100°C.

---

(+) Ces résultats font l'objet d'une publication de CHARLES et LEDOUX (1966).

Les résultats obtenus sont repris sur les Figures 12, 13, 14 et 15<sup>(+)</sup>; on peut voir que le chauffage entraîne de légères modifications dans l'importance relative des différentes fractions. Aux températures inférieures au point de fusion, rien d'important ne semble se passer. Aux températures plus élevées, l'allure générale du phénomène est la même : diminution des fractions les plus polymérisées (8 à 12) au bénéfice des fractions 5 et 7.

A 100°C (Fig. 16), après 10 minutes de chauffage, presque toutes les fractions du DNA de départ ont été transformées en fraction 7. Mais ces molécules, lorsqu'elles continuent à être chauffées à 100°C, continuent à se modifier et deviennent finalement éluables en position 5. Après 60 minutes de chauffage, le diagramme d'éluion semble se stabiliser.

Sur les Graphiques 16 et 17, on peut aussi voir que la fraction 4 diminue avec le temps et devient, elle aussi, éluable en position 5.

Des résultats obtenus on peut, semble-t-il, conclure que les fractions 1, 2 et 3 ne sont pas modifiées par chauffage, que la fraction 4 est la seule qui est désorbée après chauffage à une concentration ionique plus élevée, que toutes les autres fractions, après chauffage, sont éluées à des concentrations ioniques ou à des pH plus bas.

De ces deux études (hydrolyse enzymatique et dénaturation thermique), il semble qu'on puisse tirer un certain nombre de conclusions.

---

(+) On peut aussi voir qu'en refroidissant lentement les solutions après chauffage, on n'observe pas de renaturation comme avec les DNA bactériens.

a	b				
1	1	PHOSPHATE	0.01 M	NaCl	-
2	2		0.01 M		0.14 M
3	3		0.01 M		0.50 M
4	4		0.01 M		1.00 M
5		NH <sub>3</sub>	0.05 M		1.00 M
6			0.05 M		2.00 M
7	5		0.20 M		2.00 M
8			0.40 M		2.00 M
9			1.00 M		2.00 M
10		NaOH	0.10 M		
11			0.50 M		
12	6		1.00 M		

Figure 19.

Correspondance entre les éluants

a : technique avec 12 éluants

b : technique avec 6 éluants.

Outre l'interrelation existant entre les différentes fractions, on peut se rendre compte que toutes les fractions peuvent subir l'action de la DNase et que les produits obtenus s'éluent à des concentrations ioniques plus faibles<sup>(+)</sup>.

La dénaturation produit un remaniement profond dans le diagramme d'éluion. Par chromatographie sur pulpe de papier de DEAE-cellulose, on ne parvient pas à séparer les formes natives et dénaturées du DNA (les fractions 7 et 5, par exemple, peuvent très bien contenir des molécules natives ou dénaturées ou un mélange des deux).

Ces résultats montrent enfin, que la chromatographie sur pulpe de papier de DEAE-cellulose peut être utilisée pour l'étude de modifications apparaissant dans une population de molécules de DNA soumises à l'action de différents agents physiques ou biologiques.

---

(+) La Figure 18 montre les résultats obtenus par la méthode de chromatographie avec 12 éluants lors de l'hydrolyse enzymatique. Dans ce cas, à la plus faible concentration en enzyme, on peut voir que les modifications sont déjà très importantes et les résultats confirment ceux observés avec 6 éluants ; la viscosité suit parallèlement les modifications de la fraction 6. La Figure 19 montre la correspondance des éluants.



ETUDE DU SORT DU DNA INJECTE CHEZ LA SOURIS

---

INJECTION INTRAVEINEUSE DE DNA TRITIE HETEROLOGUE A LA SOURIS

Pour toutes nos expériences, nous avons utilisé des souris adultes BALB/c.

Le DNA-<sup>3</sup>H de E.coli en solution saline citratée (NaCl 0.15 M citrate trisodique 0.015 M) est injecté dans la veine caudale.

Seuls, les animaux chez qui l'injection avait pleinement réussi, ont été gardés pour les examens ultérieurs.

Pour l'injection, l'animal est maintenu dans un cylindre percé de trous pour l'aération. A l'une des extrémités du cylindre, une encoche dans le bouchon de fermeture permet de maintenir la queue de l'animal hors de l'appareil. L'injection se fait aussi rapidement que possible.

La fin de l'injection est considérée comme temps 0 de l'expérience proprement dite.

Suivant les expériences, nous avons injecté de 10 à 200 microgrammes de DNA par animal.

Du sang (50 microlitres) est prélevé à différents moments après l'injection, soit par ponction à l'aide d'un capillaire héparinisé dans le sinus rétro-orbital, soit en fin d'expérience par ponction cardiaque après légère anesthésie à l'éther.

## 1. Le sang.

### 1.1 - Etude biochimique

Nous avons estimé le nombre de désintégrations par minute (dpm) au temps 0, en considérant que le DNA-<sup>3</sup>H se mélangeait au sang de façon presque instantanée et que la radioactivité injectée se diluait dans un volume moyen de 2 ml de sang total.

Les différents échantillons prélevés (50 µl de sang total) ont été digérés à température ambiante dans 250 µl d'hyamine base 0.5 M dans le méthanol et leur radioactivité a été mesurée en présence de 15 ml de mélange scintillant DAV par scintillation liquide<sup>(+)</sup>.

L'efficacité du comptage est, dans ce cas, égale à environ 1,5 %.

Les Graphiques 20, 21 et 22 montrent la variation de la radioactivité du sang. On peut voir que celle-ci disparaît très rapidement du sang circulant.

Différentes expériences nous ont montré que le temps de demi-disparition est une fonction de la quantité injectée (Fig.23).

Nous observons également que la radioactivité ne disparaît pas complètement pendant les temps étudiés.

Le séjour du DNA-<sup>3</sup>H dans le sang apparaît donc comme très court.

Afin de déterminer si sa disparition est accompagnée ou non d'une dégradation, des échantillons ont été extraits par du P.C.A. à 5 % à 0°C (pendant 30 minutes).

---

(+) Les comptages sont effectués de telle manière que l'erreur soit inférieure à 3 %.

Pour faciliter la précipitation de la fraction insoluble, nous avons ajouté aux échantillons (50  $\mu$ l de sang) 50  $\mu$ g de DNA non radioactif de thymus de veau, comme entraîneur.

Notons que le DNA- $^3\text{H}$  injecté provenait d'une préparation fraîche et libre de fraction acido-soluble.

Le Graphique 24 montre qu'il n'y a pas apparition d'une radioactivité acido-soluble importante pendant le séjour du DNA tritié dans le sang. La courbe de disparition de la radioactivité semble liée à la fraction insoluble et est comparable à celle obtenue à partir du sang total.

Notons cependant qu'une faible radioactivité acido-soluble apparaît à un moment où 80 % de la radioactivité totale a disparu.

Bien que nous ne voyions pas, pendant le séjour du DNA tritié dans le sang, apparaître de composants acido-solubles en quantité importante, il se pourrait évidemment que les produits d'une hydrolyse éventuelle soient éliminés très rapidement.

En effet, l'étude cinétique de la disparition de la thymidine- $^3\text{H}$  injectée par voie intraveineuse, nous a montré (Graphique 25) qu'elle disparaît rapidement du sang circulant. Des résultats analogues avaient été trouvés par CRONKITE, BOND, FLIENDER et RUBINI (1959).

Nous avons, par conséquent, essayé de préciser ce point en utilisant :

- 1) du sang incubé in vitro, en présence de DNA- $^3\text{H}$ ,
- 2) du sang circulant dans des organes perfusés in vitro.

Du sang héparinisé (aliquote d'un mélange de sang provenant de plusieurs animaux) est incubé à 37°C en présence de DNA-<sup>3</sup>H de E.coli fraîchement préparé, polymérisé et pauvre en composés acido-solubles.

La quantité de DNA-<sup>3</sup>H mise en présence du sang est comparable à celles utilisées lors des injections intraveineuses (40 microgrammes de DNA-<sup>3</sup>H par ml de sang). Des échantillons sont prélevés à différents moments après le début de l'expérience et sont analysés suivant la technique de SCHMIDT-THANNHAUSER (1945) ou suivant notre technique de chromatographie.

La Figure 26A montre que pendant des temps correspondant au séjour du DNA dans le sang lors de l'injection de l'animal, on n'observe pas, in vitro, l'apparition de fractions acido-solubles.

Même après 60 minutes d'incubation, à un temps où, chez l'animal, le DNA injecté a totalement disparu, la radioactivité acido-soluble est restée la même qu'au début de l'expérience. Il semble qu'on puisse conclure que la quantité de DNase neutre pouvant agir sur le DNA est très faible dans le sang des animaux utilisés ou que l'enzyme ne peut pas se manifester dans les conditions expérimentales.

On sait, en effet, que l'activité de la DNase du plasma peut varier considérablement d'une race de souris à une autre (PASCAUD, Thèse, 1964, cité par TRUHAUT, DELACROIX et PAOLETTI, 1965) et que cette activité peut être inhibée par des substances libérées, au moment du prélèvement, à partir de certains éléments figurés du sang (HERRIOTT, CONOLLY et GUPTA, 1961 ; CONOLLY, HERRIOTT et GUPTA, 1962)

L'analyse par chromatographie sur papier de DEAE-cellulose confirme les résultats obtenus par voie chimique (Figure 26). On voit que les fractions acido-solubles n'augmentent pas pendant toute la durée de l'expérience.

On doit cependant noter un remaniement au sein des fractions polymérisées acido-insolubles (4, 5 et 6). Ce remaniement, qui s'accompagne d'une diminution des fractions les plus polymérisées au profit d'autres moins polymérisées, indique une diminution du poids moléculaire et, vraisemblablement, une faible action enzymatique.

La perfusion d'organes nous a, d'autre part, permis d'étudier ce que devient le DNA-<sup>3</sup>H lorsqu'il est ajouté au liquide de perfusion.

Les éviscérations -enlèvement du foie, du tractus gastro-intestinal - ont été effectuées selon la technique de INGLE (1949). Pour la perfusion, la technique de MILLER, BLY, WATSON et BALE (1951) a été suivie dans le cas du foie et celle décrite par GERBER et REMY-DEFRAIGNE (1966), dans le cas de l'intestin.

Le liquide de perfusion est composé de 50 ml de sang héparinisé, dilué par de la solution de Ringer (2 : 1), il contient en outre 150 mg de glucose et 50 µg de DNA-<sup>3</sup>H.

Les conditions de perfusion sont choisies telles que les fonctions biochimiques normales des organes soient peu perturbées. C'est ainsi que ces organes restent capables d'utiliser le glucose, de synthétiser le DNA à partir de thymidine, de synthétiser l'urée (foie).

Tableau 27

Perfusion d'intestin par 50  $\mu$ l de sang héparinisé  
 contenant 50  $\mu$ g de DNA-<sup>3</sup>H E.coli  
 (activité spécifique =  $2.3 \times 10^6$  dpm/ $\mu$ g)

<u>SANG</u> : dpm pour 50 $\mu$ l de sang			
	2 min	15 min	30 min
Fractions			
n.a.	90	210	450
1.	150	120	420
2.	100	120	350
	<hr/> 340	<hr/> 450	<hr/> 1.220
3.	8.400	10.500	12.000
4.	23.400	29.800	32.400
5.	27.600	21.000	16.500
6.	28.200	18.300	9.900
	<hr/> 87.600	<hr/> 79.600	<hr/> 70.800
	87.940	80.050	72.020

ORGANE : intestin : dpm pour 50 mg de tissu

Après 5 minutes : 27.400

Après 15 minutes : 52.000

Après 30 minutes : 117.500

Des échantillons de sang ont été prélevés à différents moments après le début de l'expérience et nous avons cherché, par chromatographie, les modifications éventuelles des caractéristiques physico-chimiques du DNA et, notamment, l'apparition de fractions acido-solubles.

Le Tableau 27<sup>(+)</sup> montre qu'on observe une disparition de radioactivité sans apparition en quantité importante de composants acido-solubles, alors que dans le système utilisé, on travaille en vase clos et qu'une élimination des produits de dégradation éventuelle est impossible, si ce n'est dans l'organe perfusé lui-même. L'étude de celui-ci nous montre que la radioactivité qu'on y retrouve est portée, en ordre principal, par du matériel acido-insoluble.

Il semble donc, aussi bien in vitro qu'in vivo, que ce n'est qu'en faible quantité que la radioactivité acido-soluble apparaît dans le sang.

---

(+) Les résultats de ces expériences ont fait l'objet d'une note préliminaire en collaboration avec LEDOUX et GERBER (1963) et une autre note est en préparation.

Tableau 28

Chromatographie d'un échantillon de sang héparinisé contenant du DNA-<sup>3</sup>H de E.coli.

- Quantité de pulpe de papier de DEAE-cellulose sèche : 0.2 g.
- Quantité de sang : 50 µl dilués dans 2 ml d'une solution saline d'EDTA contenant 1 % de Duponol
- Volume des éluants à chaque passage : 2 ml
- Centrifugation à 500 t/m pendant 3 à 5 min. pour accélérer l'éluion.

	cpm	Pourcentage du total de la fraction
Eluant 1 - 1ère éluion	200	47
2ème "	170	40
3ème "	60	13
	430	
Eluant 2 - 1ère éluion	220	52
2ème "	150	36
3ème "	50	12
	420	
Eluant 3 - 1ère éluion	650	87
2ème "	70	9
3ème "	30	4
	750	
Eluant 4 - 1ère éluion	24.000	74
2ème "	4.600	14,2
3ème "	1.800	5,5
4ème "	1.250	3,7
5ème "	850	2,6
	32.500	
Eluant 5 - 1ère éluion	25.700	58,3
2ème "	11.400	25,9
3ème "	3.300	7,5
4ème "	2.700	6,1
5ème "	1.000	2,2
	44.100	
Eluant 6 - 1ère éluion	21.000	96,2
2ème "	750	3,4
3ème "	50	0,4
	21.800	



## 1.2 - Etude chromatographique

La chromatographie sur papier de DEAE-cellulose permet de fractionner le DNA en molécules de plus en plus polymérisées. L'examen des divers échantillons de sang, par cette méthode, devrait permettre d'analyser plus en détail les actions éventuelles que pourrait subir le DNA-<sup>3</sup>H pendant son séjour dans le sang<sup>(+)</sup>.

De plus, l'étude de la cinétique des modifications observées devrait permettre de préciser le devenir des molécules présentes dans le sang.

Pour ce faire, le sang est prélevé d'un animal injecté et les échantillons sont immédiatement dilués dans une solution saline contenant de l'éthylène diamine tétra-acétate de sodium (EDTA) (0.15 M NaCl - 0.1 M EDTA pH 8) et les éléments figurés sont lysés par action du sodium dodécyl sulfate (à la concentration finale de 1 %).

Les échantillons sont alors adsorbés sur la pulpe de papier et soumis à la chromatographie.

Plusieurs volumes de chaque éluant sont utilisés successivement de manière à obtenir une désorption complète de la fraction étudiée. Dans le cas du sang, l'analyse montre que la désorption est rapide (Tableau 28). Une digestion de la résine après chromatographie nous permet d'estimer l'importance d'une rétention éventuelle de la radioactivité sur le papier après la dernière élution.

---

(+) Nous avons vu lors de l'étude par chromatographie de l'hydrolyse enzymatique et de la dénaturation thermique, que ces divers traitements modifiaient profondément les diagrammes d'élution.

Tableau 29

Bilan : Echantillon : sang contenant 50 µg de DNA-<sup>3</sup>H de E.coli  
 Chromatographie de 50 µl de sang et 2.5 µg de DNA-<sup>3</sup>H  
 Activité spécifique du DNA-<sup>3</sup>H : 1.940.000 dpm/µg  
 L'échantillon analysé contient : 4.850.000 dpm  
 Radioactivité retrouvée répartie sur les divers éluants :  
 4.650.000 soit 95 %.

Eluants	cpm/éluant total	Facteur de rendement	dpm/éluant
1	100	63	6.300
2	50	70	3.500
3	215	76	8.740
4	8.325	81	674.325
5	10.795	90	971.550
6	31.220	95	2.965.900
			<u>4.630.315</u>

Tableau 30

	0 min dpm x 10 <sup>6</sup>	10 min dpm x 10 <sup>6</sup>	30 min dpm x 10 <sup>6</sup>	60 min dpm x 10 <sup>6</sup>
Radioactivité totale:	138,0	33,5	30,5	23,0
Radioactivité				
acido soluble	1,2	8,7	16,7	20,7
acido insoluble	<u>136,2</u>	<u>24,6</u>	<u>13,5</u>	<u>2,2</u>
	137,4	33,3	30,2	22,8
Radioactivité non adsorbée	0,5	2,3	4,9	9,0
Eluant 1	0,7	4,6	11,0	9,8
" 2	-	-	0,1	0,4
" 3	-	1,6	0,6	1,2
" 4	55,0	18,1	11,0	2,5
" 5	54,6	4,5	1,0	0,7
" 6	<u>25,3</u>	<u>0,6</u>	-	-
	136,1	31,7	28,6	23,6

Lorsqu'on dresse un bilan complet, on peut voir (Tableau 29) que la totalité de la radioactivité estimée avant chromatographie se retrouve répartie sur les divers éluants.

Les résultats obtenus après l'estimation de la radioactivité totale, de la radioactivité acido-soluble et acido-insoluble et de la radioactivité retrouvée dans chaque éluant après chromatographie, ont été repris dans le Tableau 30.

On peut voir que les fractions les plus polymérisées disparaissent rapidement et que, pendant ce temps, on n'observe pas d'augmentation des fractions acido-solubles. Celles-ci apparaissent plus tardivement.

Lorsque ces différents résultats sont portés en graphique, en fonction du temps qui s'est écoulé après l'injection (Fig. 31), on voit que la vitesse de disparition est différente pour les diverses fractions.

Nous avons pu constater que ce sont les fractions les plus polymérisées qui disparaissent le plus rapidement.

L'étude cinétique de la disparition dans le sang de différentes préparations de DNA-<sup>3</sup>H a été faite à l'aide de DNA de degrés de polymérisation différents, de même qu'avec des DNA qui ont subi une certaine dégradation par autoradiolyse.

A l'aide de tels DNA, on peut voir que pour une même radioactivité injectée, le temps de demi-disparition est d'autant plus long que le DNA est moins polymérisé. Sur les Graphiques 22 et 33 on peut voir que le temps de demi-disparition est de 6 minutes après injection de 35 µg de DNA, de P.M. d'environ  $2 \times 10^6$ , alors que ce temps n'est que de 4 minutes après injection de 60 µg de DNA de P.M. d'environ  $8 \times 10^6$ .

Tableau 35.

Radioactivité totale (dpm / 2 ml sang x 10<sup>3</sup>)

Min.											
5											3750,0
10											3700,0
30											855,0
60											545,0

Radioactivité ██████ Schmidt - Thannhauser

Min.				Acido soluble						Acido insoluble	Σ A.S. + A. Ins.
5				76,5						3540,0	3526,5
10				284,0						3050,0	3334,0
30				724,0						525,0	1249,0
60				724,0						-	724,0

Radioactivité ██████ chromatographie

Min.	n.a.	1	2	Σ n.a. → 2	3	4	7	9	12	Σ 3 à 12	Σ n.a. → 12
5	-	18,9	4,4	23,3	673,5	3047,5	63,8	4,4	3,3	3792,5	3815,8
10	-	46,7	-	46,7	766,7	1980,2	41,7	13,6	-	2802,2	2848,9
30	94,5	93,5	2,7	190,7	27,6	259,0	20,1	5,5	-	312,2	502,9
60	99,2	102,5	-	201,7	-	-	-	-	-	-	201,7

Radioactivité injectée

Min.	n.a.	1	2		3	4	7	9	12		Σ
0	-	-	-		153,0	6625,0	6785,0	180,0	56,0		13.800,0

US  
LILLE

Le Graphique 32 illustre également cette observation. Les profils chromatographiques des échantillons prélevés à des moments différents après l'injection sont différents. Le pourcentage des différentes fractions change et nous voyons, par exemple, que la fraction 4 paraît avoir augmenté après 10 minutes, alors qu'en valeur absolue elle a diminué de 50 %.

### 1.3 - Etude par ultracentrifugation en gradient de CsCl

Afin de préciser la nature des molécules radioactives de DNA-<sup>3</sup>H qui circulent dans le sang nous avons soumis, à l'ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium, un échantillon de sang prélevé 10 minutes après injection de 60 microgrammes de DNA-<sup>3</sup>H.

Les analyses chimiques et chromatographiques confirment nos résultats antérieurs (Graphiques 33, 34 et Tableau 35).

Sur le Graphique 36 on peut voir que la radioactivité est portée par du matériel qui a la même densité de flottation que celle de BNA de E.coli natif (1.710 g/ml) et qu'elle se localise entre le DNA de souris natif et celui de souris dénaturé, ajoutés comme référence (densités respectives : 1.700 et 1.715g/ml).

Le DNA a donc conservé, 10 minutes après son injection dans le sang, ses caractéristiques physico-chimiques. Ses structures primaires et secondaires sont intactes et la composition en bases n'a pas changé.

Recherchant une conclusion plus précise encore, nous avons considéré le sort du DNA-<sup>3</sup>H et D<sub>2</sub>O de B.subtilis injecté par voie intraveineuse et étudié, à différents moments après l'injection, la nature des molécules radioactives, par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium.

On voit que (Fig.37)<sup>(+)</sup> la radioactivité tritium disparaît (la quantité totale diminue) ; on voit aussi que la radioactivité qui persiste, aux différents temps après l'injection, est portée par des molécules de P.M. moins élevé (la courbe de distribution s'élargit<sup>(++)</sup>) ; cependant, on ne voit pas apparaître de composés à faible poids moléculaire (acido-soluble) car la radioactivité trouvée en dehors de la courbe correspond au bruit de fond normal<sup>(+++)</sup>.

- 
- (+) Les résultats correspondent à la même quantité de matière mise en expérience et sont donc directement comparables.
  - (++) La largeur de la courbe de distribution est inversement proportionnelle au carré du P.M.
  - (+++) A l'occasion de chaque expérience, des échantillons de matériel non radioactif sont aussi traités afin de déterminer le bruit de fond normal pour le tissu ou l'organe étudié.

## DISCUSSION

Des résultats observés, il nous semble possible de conclure que le DNA-<sup>3</sup>H disparaît rapidement du sang sans avoir, nécessairement, subi de profondes modifications. Nos résultats sont en accord avec ceux observés par TSUMITA et IWANANGA (1963) lors de l'injection de DNA-<sup>3</sup>H à la souris.

La courbe de disparition de la radioactivité paraît, pour ces auteurs comme pour nous, pouvoir être décomposée en deux phases : une première, pendant laquelle disparaît la plus grande partie de la radioactivité et une seconde phase, plus longue, pendant laquelle le restant de la radioactivité disparaît plus lentement. En examinant la nature chimique des molécules radioactives présentes dans le sang à différents moments après l'injection - par la méthode de SCHNEIDER (1945), ces auteurs ont trouvé des résultats semblables aux nôtres.

Une étude du sort du DNA dans le sang après injection intraveineuse chez la souris, a également été faite par GOSSE, LE PECQ, DEFRANCE et PAOLETTI (1965).

Ces auteurs ont mis en évidence la présence de désoxyribonucléase dans le plasma des souris. Ils ont étudié, par viscosimétrie, le sort du DNA exogène et l'ont mis en relation avec l'activité désoxyribonucléasique.

Des résultats obtenus, ils concluent que la cinétique de disparition des polydésoxyribonucléotides est fonction de l'activité de la DNase neutre du plasma mais, qu'en revanche, l'hydrolyse enzymatique n'est pas le seul mécanisme responsable de la perte de viscosité observée dans le sang.

Les résultats décrits par ces auteurs montrent que la vitesse de disparition du DNA acido-insoluble est appréciable, même en l'absence d'activité DNAsique dans le sang.

Il semble bien que cette disparition corresponde à ce que nous observons<sup>(+)</sup>. Ajoutons, de plus, que ce sont les fractions les plus polymérisées qui sont responsables de la viscosité ; or, nous avons vu qu'elles disparaissent en premier lieu du sang. Dès lors, la chute de viscosité observée par GOSSE, LE PECQ, DEFRANCE et PAOLETTI pourrait s'expliquer par cette élimination sélective.

Récemment, BENDICH, WILCZOK et BORENFREUND (1965) ont montré que du DNA transformant de Pneumococcus et du DNA infectieux (virus de polyoma) ont été retrouvés actifs dans le sang après avoir été injecté intrapéritonéalement chez la souris.

Ces observations apportent un argument de poids et une preuve supplémentaire. Le DNA, dans le sang, ne subit pas de modification profonde et, s'il y a une activité hydrolytique, elle est faible puisqu'elle respecte des molécules ou parties de molécules de DNA porteuses d'informations biologiques.

(+) Nous examinerons plus loin le sort de ce DNA dans les différents organes de la souris. Les résultats permettront de préciser la raison de la disparition observée dans le sang, en l'attribuant à une absorption par les tissus vivants.



Tableau 38

Radioactivité totale de certains organes et tissus

Souris tumorales injectées de			
30 µg de DNA- <sup>3</sup> H (activité spécifique 9 x 10 <sup>6</sup> dpm/µg) soit 120 µCi.		75 µg de DNA- <sup>3</sup> H (activité spécifique 1,7 x 10 <sup>6</sup> dpm/µg) soit 57 µCi.	
et sacrifiées après 10 minutes			
	par g de tissu		par g de tissu
Ovaires	5.700 x 10 <sup>3</sup> dpm	Ovaires	875 x 10 <sup>3</sup> dpm
Tumeur	4.280	Utérus	475
Peau	3.710	Vagin	431
Reins	2.792	Rate	306
Intestin	2.423	Coeur	168
Poumons	1.795	Muscles	143
Rate	1.746	Peau	137
Vagin	1.735	Tumeur	131
Utérus	1.521	Cerveau	100
Coeur	1.301	Poumons	96
Cerveau	905	Reins	69
Muscles	601	Intestin	56
Foie	319		



## 2. Les organes

### 2.1 - Etude de la distribution de la radioactivité dans l'animal

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que le DNA injecté par voie intraveineuse disparaissait rapidement du sang.

Pour connaître le sort du DNA injecté, nous avons étudié divers organes et tissus en y recherchant tout d'abord la présence de radioactivité totale et au niveau des composés acido-solubles ou acido-insolubles.

#### a) Souris porteuses d'une tumeur solide spontanée.

Le Tableau 38 reprend les résultats obtenus après injection de DNA-<sup>3</sup>H. La quantité injectée et l'activité spécifique du DNA étaient différentes lors des deux expériences.

Dans tous les organes ou tissus étudiés, nous avons retrouvé des molécules radioactives. Les quantités sont très variables et l'examen des résultats semble montrer qu'elles ne proviennent pas d'une répartition uniforme de la substance injectée dans l'organisme :  $270 \times 10^6$  dpm et  $127 \times 10^6$  dpm ayant été injectés, nous devrions retrouver dans ce cas, environ  $10 \times 10^6$  dpm et  $5 \times 10^6$  dpm par gramme de tissu.

Comme les échantillons ont été soigneusement lavés et perfusés par de l'eau physiologique lors du prélèvement, la contamination éventuelle par le sang est certainement faible. Le sang est encore très radioactif 10 minutes après l'injection du DNA-<sup>3</sup>H, les organes les plus radioactifs ne sont d'ailleurs pas ceux qui sont le mieux vascularisés.

Tableau 39

Radioactivité acido-soluble ou acido-insoluble de certains organes ou tissus de souris porteuses d'une tumeur solide spontanée, injectées de 30 µg de DNA-<sup>3</sup>H (activité spécifique : 9 x 10<sup>6</sup> dpm/µg) soit 120 µCi et sacrifiées après 10 minutes.

	Radioactivité x 10 <sup>3</sup> dpm/g tissu		
	Acido-soluble	Acido-insoluble	Rapport acido-insoluble/ acido-soluble.
Ovaires	2.600	3.112	1,20
Tumeur	2.320	1.930	0,83
Peau	1.980	1.760	0,82
Reins	1.775	1.026	0,58
Rate	1.220	530	0,43
Vagin	1.180	552	0,46
Intestin	843	1.590	1,88
Cerveau	701	201	0,28
Coeur	771	539	0,70
Utérus	743	780	1,05
Poumons	626	1.170	1,86
Foie	285	37	0,13
Muscles	204	403	2,00



Classement en fonction du rapport :

muscles - intestin - poumons - ovaires - utérus - tumeur -  
peau - coeur - reins - vagin - rate - cerveau - foie.

Les organes étant classés en fonction de la radioactivité retrouvée, nous pouvons voir que l'ordre de ce classement diffère d'une expérience à l'autre. La radioactivité retrouvée n'est pas directement proportionnelle à l'importance de la radioactivité injectée.

Dans le cas des ovaires (où nous retrouvons la radioactivité la plus élevée), pour  $270 \times 10^6$  dpm injectés,  $5,7 \times 10^6$  dpm par gramme d'organes sont observés, tandis que pour  $127 \times 10^6$  dpm injectés, la radioactivité s'élève à  $0,8 \times 10^6$  dpm par gramme. Dans le cas de l'intestin, les chiffres sont tout aussi différents :

pour $270 \times 10^6$ dpm	—————>	$2,40 \times 10^6$ dpm par gramme
pour $127 \times 10^6$ dpm	—————>	$0,56 \times 10^6$ dpm par gramme.

HINRICHS, PETERSEN et BASERGA (1964) ont estimé à 14 à 16 mg le contenu en DNA d'une souris de 22 à 24 g. Les quantités de DNA étranger que nous injectons (30, 75, 100 et parfois 200 microgrammes par animal) représentent au maximum 1 % du DNA endogène.

Nous avons étudié la radioactivité retrouvée en la fractionnant en acido-soluble et insoluble, selon SCHMIDT et THANNHAUSER (1945). Les résultats obtenus sont repris du Tableau 39 et nous pouvons voir que le rapport des deux fractions est très variable.

b) Souris impubères.

Nous avons montré (LEDOUX et CHARLES, 1961) que les organes sexuels de souris impubères (âgées de 18 à 20 jours), injectées par voie sous-cutanée, de 10 microgrammes de benzoate d'oestradiol dissous dans de l'huile officinale, sont le siège d'un enrichissement considérable en acides nucléiques et en protéines

comme dans le cas de souris castrées traitées à l'oestradiol (JEENER, 1948). La teneur en DNA augmente principalement dans l'utérus : 100 % contre 50 % dans le vagin, après 72 heures d'hyperplasie.

Nous avons étudié dans les organes génitaux et dans ces conditions d'hyperplasie provoquée, le sort du DNA injecté par voie intraveineuse. Parallèlement, des animaux ont été, dans les mêmes conditions, injectés de thymidine- $^3\text{H}$  (TdR- $^3\text{H}$ ). Les produits radioactifs (DNA et TdR) avaient la même activité spécifique (1 Ci/mM). A différents temps après le déclenchement de l'hyperplasie, 30  $\mu\text{Ci}$  sont injectés par voie intraveineuse. Les animaux sont sacrifiés après 30 minutes.

Les organes génitaux (ovaires, utérus et vagin) sont disséqués, lavés à l'eau physiologique et analysés selon la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945). Les résultats observés ont été portés sur graphique (Fig.40) et on peut voir que, dans le cas d'injection de DNA- $^3\text{H}$ , la quantité de radioactivité retrouvée est variable dans les ovaires et le vagin ; elle est nulle ou presque dans l'utérus.

Cette quantité varie également en fonction du temps d'hyperplasie (temps écoulé entre le moment de l'injection du benzoate d'oestradiol et celui de l'injection de DNA- $^3\text{H}$ ).

Le Graphique 40 montre l'existence de vagues d'incorporation dans le cas des ovaires et du vagin, avec un maximum aux environs de la 18ème et de la 30ème heure pour les ovaires, de la 12ème et de la 30ème heure pour le vagin.

Dans l'utérus, on n'observe que peu ou pas d'incorporation.

Le Graphique 41 reprend les résultats observés lors de l'injection de thymidine- $^3\text{H}$ . L'activité spécifique des DNA extraits des organes a été portée en ordonnée, les temps d'hyperplasie étant portés en abscisse.

Ici, également, la quantité de radioactivité retrouvée dans les différents organes est variable. Contrairement à ce que l'on observe lors d'injections de DNA- $^3\text{H}$ , avec la thymidine- $^3\text{H}$ , c'est l'utérus cette fois qui est le plus radioactif.

Sur les Graphiques 42, 43 et 44, les résultats observés après injection de DNA- $^3\text{H}$  et ceux obtenus après injection de thymidine- $^3\text{H}$  sont mis en parallèle pour un même organe. Les vagues d'incorporation sont légèrement déplacées dans le cas de l'ovaire, les maximum s'observent à peu près aux mêmes temps d'hyperplasie, dans le cas du vagin.

On voit également que l'ovaire et le vagin utilisent mieux le DNA- $^3\text{H}$  que la thymidine- $^3\text{H}$ . Avec l'utérus, la situation est tout à fait différente car, s'il incorpore très bien la thymidine, il n'incorpore que très faiblement le DNA- $^3\text{H}$  exogène.

## 2.2 - Etude du degré de polymérisation des molécules radioactives par chromatographie sur pulpe de papier de DEAE-cellulose.

La méthode de chromatographie est basée sur l'élution différentielle des molécules de DNA de P.M. différent (DAVILA, CHARLES et LEDOUX, 1965a).

Nous avons vu (DAVILA, CHARLES et LEDOUX, 1965b) que les DNA pouvaient être caractérisés par leur profil chromatographique. Cette méthode permet de suivre d'une façon assez fine les modifications de ce profil au cours de divers traitements : hydrolyse

enzymatique, dénaturation, vieillissement et autoradiolyse pour les produits radioactifs.

Nous avons étudié par cette méthode, les DNA isolés de divers organes ou tissus d'animaux injectés de DNA-<sup>3</sup>H, en faisant varier les conditions expérimentales.

Nous avons ainsi injecté des souris porteuses d'une tumeur mammaire spontanée, des souris tumorales gravides, des souris normales gravides, des souris impubères soumises à une stimulation hormonale.

Les animaux ont été sacrifiés à des temps plus ou moins longs après l'injection (10, 30, 60, 120 et 1440 minutes). Nous avons injecté des quantités variables de DNA. Nous avons aussi utilisé des DNA-<sup>3</sup>H dont la radioactivité spécifique était très différente.

A cause de l'autoradiolyse des solutions utilisées, nous disposons également de DNA de P.M. variable (LEDOUX, DAVILA, HUART et CHARLES, 1963) ; des DNA très polymérisés avec un poids moléculaire de plusieurs millions; d'autres de P.M. inférieur à  $1 \times 10^6$ .

a) Souris porteuses d'un carcinome mammaire spontané

Deux lots d'animaux ont été injectés de DNA-<sup>3</sup>H différents.

Dans le premier cas, nous avons injecté 30 microgrammes de DNA-<sup>3</sup>H très radioactif (activité spécifique  $9 \times 10^6$  dpm/ $\mu$ g) mais dégradé par autoradiolyse. A l'analyse chromatographique, ce DNA était caractérisé par une fraction 4 très importante (65 %).

Tableau 45

Chromatographie centrifugée sur pulpe de papier de DEAE-cellulose  
de DNA de différents organes ou tissus de souris  
porteuses d'une tumeur mammaire solide spontanée, injectées de  
30 µg de DNA-<sup>3</sup>H (activité spécifique  $9 \times 10^6$  dpm/µg), soit 120 µCi  
et sacrifiées après 10 minutes.

( x 10 <sup>3</sup> dpm par g de tissu )						
	1	2	3	4	5	6
Tumeur	1.619	357	342	1.681	138	113
Intestin	230	311	302	1.493	55	37
Rate	246	601	369	465	43	21
Foie	179	44	62	16	10	10
Poumons	225	315	86	988	92	91
Coeur	422	167	181	348	68	122
Muscles	81	87	35	317	33	52
Peau	325	1.190	465	1.633	77	53
Vagin	429	498	253	305	114	132
Utérus	226	250	267	563	94	124
Ovaires	277	1.689	625	2.900	36	77
Cerveau	280	333	88	117	42	43
Sang	16.520	27.400	57.600	14.440	1.470	1.056





Dans le second cas, les animaux ont reçu par voie intraveineuse, 75 microgrammes de DNA-<sup>3</sup>H d'activité spécifique moins élevée ( $1,7 \times 10^6$  dpm/ $\mu$ g).

Ce DNA fraîchement préparé était très polymérisé (P.M.  $14 \times 10^6$  estimé d'après sa constante de sédimentation) et à l'analyse chromatographique, son profil était caractérisé par des fractions 5 et 6 importantes (respectivement 44 et 53 %).

Dans les deux expériences, les animaux sont sacrifiés 10 minutes après l'injection. Les organes ou tissus sont prélevés, lavés et congelés et les homogénats préparés comme nous l'avons exposé plus haut (Méthodes).

Les résultats obtenus sont repris dans le Tableau 45.

Les profils chromatographiques, caractéristiques des échantillons analysés, ont été dessinés sur le Graphique 46. On remarque tout d'abord des différences quantitatives significatives entre les différents organes. Le Tableau 45 et le Graphique 46 illustrent cette constatation.

Il existe, de plus, des variations très nettes et significatives dans les diagrammes d'éluion de la radioactivité.

Pour les ovaires, la peau, la tumeur, l'intestin, les poumons, nous constatons que les schémas d'éluion des fractions polymérisées (3, 4, 5 et 6) sont semblables à celui du DNA injecté et différent du schéma du DNA encore présent dans le sang au moment du sacrifice. Ces organes paraissent, en outre, être les plus avides en DNA-<sup>3</sup>H exogène.

Dans les autres organes étudiés, les diagrammes d'éluion indiquent une certaine dégradation du DNA injecté (à moins qu'il ne s'agisse, dans ce cas, d'une absorption sélective et préférentielle de fractions à faible poids moléculaire).

Ces observations semblent encore plus évidentes lorsqu'on examine le Graphique 47 (DNA fraîchement préparé et très polymérisé). Certains organes ont été plus spécialement étudiés et sur le Graphique 48, nous reprenons les résultats obtenus lors d'une expérience où des animaux porteurs d'un carcinome mammaire spontané ont été injectés avec du DNA-<sup>3</sup>H et sacrifiés 30 minutes après l'injection. Ces souris ont reçu par voie intraveineuse 100 microgrammes de DNA-<sup>3</sup>H. Nous avons vu que, dans ce cas, il ne reste plus dans le sang, après 30 minutes, qu'environ 20 % de la radioactivité injectée et que celle-ci est portée par des molécules acido-solubles ou de faible poids moléculaire.

Trente minutes après l'injection, nous retrouvons dans les organes génitaux et la tumeur, des molécules radioactives qui s'éluent suivant le même schéma que celui du DNA injecté. Dans la tumeur nous observons, en outre, une fraction importante de poids moléculaire moins élevé.

Afin d'étudier le sort ultérieur de ces molécules, des lots de souris porteuses d'une tumeur mammaire ont été injectées d'une solution de DNA fraîchement préparé, hautement polymérisé et à activité spécifique élevée (2.550.000 dpm/microgramme, soit 1,5 Ci/mM).

Les animaux ont reçu 40 microgrammes de DNA-<sup>3</sup>H (soit 44 µCi) et ont été sacrifiés à différents moments après l'injection.

Les résultats de la cinétique d'incorporation et du sort ultérieur de la radioactivité sont représentés graphiquement (Fig. 50, 51 et 52).

Tableau 55a

Chromatographie centrifugée de DNA de différents organes ou  
tissus de souris gravides, injectées de 35 µg de DNA-<sup>3</sup>H  
(activité spécifique 4,2 x 10<sup>6</sup> dpm/µg), soit 63,5 µCi  
et sacrifiées après 10, 30 et 60 minutes.

( x 10<sup>3</sup> dpm par g de tissu )

Après 10 minutes							
	Embryons	Vagin	Ovaires	Utérus	Placenta	Intestin	Foie
1	1.072	3.300	5.200	272	680	400	400
2	372	1.800	4.360	350	690	450	350
3	310	1.340	1.986	167	535	414	384
4	766	4.095	7.600	625	643	248	437
5	1.445	2.325	3.710	337	8.700	5.950	6.460
6	2.895	8.135	17.630	750	3.578	2.595	3.138
Total:	6.890	20.995	40.486	2.501	14.826	10.057	11.169
Après 30 minutes							
1	420	920	1.520	323	198	116	412
2	236	136	510	65	27	62	26
3	180	498	116	344	87	102	141
4	232	3.065	31	3.980	420	302	463
5	766	3.300	3.970	2.220	242	236	304
6	2.044	4.585	7.660	5.458	524	292	419
Total:	3.878	12.504	13.807	12.390	1.498	1.110	1.765
Après 60 minutes							
1	532	204	1.410	1.700			690
2	12	21	912	72			12
3	35	173	401	128			119
4	174	3.900	1.160	1.140			121
5	670	3.260	4.245	485			85
6	1.420	4.750	6.160	1.215			327
Total:	2.843	12.308	14.288	4.740			1.354

Nous avons étudié les organes génitaux et le tissu tumoral qui semblaient fixer le DNA exogène sans dégradation importante. A titre de comparaison, les Graphiques 51 et 52 montrent aussi les résultats obtenus pour le foie et l'intestin. On voit que dans les ovaires, le vagin et la tumeur, la proportion des différentes fractions polymérisées reste la même durant toute l'expérience.

Ces organes ou tissus, semblent donc absorber et garder le DNA-<sup>3</sup>H.

L'utérus, l'intestin et le foie absorbent le DNA-<sup>3</sup>H, mais semblent en relâcher une partie. Ultérieurement, on observe un remaniement profond des molécules radioactives présentes.

b) Souris en gestation.

Des souris fécondées depuis 12 jours sont injectées de 35 microgrammes de DNA-<sup>3</sup>H polymérisé (activité spécifique  $4,2 \times 10^6$  dpm/ $\mu$ g, soit 2,5 Ci/mM). Les animaux sont sacrifiés 10, 30 et 60 minutes après l'injection.

Les Graphiques 53, 54 et 55 montrent les diagrammes d'élution de la radioactivité retrouvée dans les différents organes au moment du sacrifice des animaux.

Les résultats montrent que les embryons, aux différents temps examinés, sont porteurs d'une radioactivité dont le diagramme d'élution rappelle celui du DNA-<sup>3</sup>H injecté. Le Tableau 55a montre aussi que dans tous les organes ou tissus examinés à ce temps de 30 minutes, la radioactivité a diminué, sauf dans l'utérus où au contraire, elle a augmenté.

Tableau 57

Chromatographie des DNA extraits de divers organes et tissus de souris gravides porteuses d'une tumeur spontanée, injectées de 100 µg de DNA-<sup>3</sup>H (activité spécifique 1,5 x 10<sup>6</sup> dpm/µg) soit 67 µCi et sacrifiées 120 ou 1440 minutes après l'injection (en cpm/50 mg de tissu)

2 = acido-soluble

3 à 6 = fractionnement de la fraction acido-insoluble.

BUS  
LILLE

Après 120 minutes										
	Tumeur	Ovaires	Vagin	Utérus	Embryons	Placenta	Rate	Foie	Reins	Intestin
2	34	377	53	40	45	54	38	35	59	14
3	49	423	407	9	72	98	11	56	60	39
4	1.426	916	1.281	380	626	689	2.945	201	159	1.315
5	433	593	588	48	251	228	1.391	70	32	379
6	188	339	111	65	92	107	611	57	27	185
Après 1440 minutes										
2	536	47	55	364	118	77	103	52	38	26
3	2.933	87	18	2.798	361	126	284	30	102	78
4	4.339	522	188	5.248	1.378	808	981	126	319	1.324
5	620	161	83	740	409	180	303	46	70	586
6	204	85	50	82	179	102	240	8	8	425

Les Graphiques 53, 54 et 55 indiquent que pour les embryons, le vagin et les ovaires, malgré ces modifications quantitatives, les schémas d'élution de la radioactivité restent comparables. Ces résultats ne nous permettant pas d'exclure complètement l'existence de processus de synthèse à partir de petites molécules (DNA dégradé in vivo), nous avons traité parallèlement deux lots d'animaux : les uns ont reçu 30  $\mu\text{Ci}$  de thymidine tritiée (1 Ci/mM) ; les autres 30  $\mu\text{Ci}$  de DNA- $^3\text{H}$  (1 Ci/mM).

Le Graphique 56 montre la radioactivité spécifique des différentes fractions du DNA isolé des embryons de souris. On voit que les schémas observés 10 ou 120 minutes après l'injection de DNA- $^3\text{H}$  sont comparables, tandis que chez les animaux injectés de TdR- $^3\text{H}$ , la quantité de radioactivité incorporée varie très fortement au cours du temps. Notons également que le schéma d'élution est tout à fait différent de celui qu'on observe dans les animaux injectés de DNA- $^3\text{H}$ .

c) Souris tumorales en gestation.

Le Tableau 57 et les Graphiques 58 et 59 montrent les résultats obtenus par chromatographie sur papier de DEAE-cellulose, en injectant des souris tumorales et gravides de 100 microgrammes de DNA- $^3\text{H}$  (partiellement dépolymérisé, surtout riche en fraction 4).

Les animaux ont été sacrifiés 2 ou 24 heures après l'injection. Les résultats observés confirment ceux déjà obtenus.

Après 2 ou 24 heures, les diagrammes d'élution de la radioactivité retrouvée dans la tumeur, les ovaires et les embryons, sont comparables à celui du DNA injecté.

## CONCLUSION

Nous avons vu que la distribution de la radioactivité, lors de l'absorption de DNA-<sup>3</sup>H par les organes génitaux de souris impubères et par les embryons, était différente de la distribution de la radioactivité du DNA synthétisé à partir de thymidine-<sup>3</sup>H.

Nous venons de voir que certains états physiologiques (gravidité ou état tumoral) qui, d'après certains auteurs (KELLY, PAYNE, WHITE et JONES, 1951) influencent les mécanismes de synthèse normale<sup>(+)</sup>, sont sans effet sur la pénétration et la fixation de DNA exogène injecté aux animaux.

On est tenté de conclure que certains organes ou tissus sont capables d'absorber et de fixer, sans grande dégradation, du DNA exogène.

Cependant, les résultats qui ont été obtenus dans des conditions très différentes et qui se confirment l'un l'autre, ne constituent pas une preuve absolue.

Nous ne pouvons affirmer que la radioactivité, que nous retrouvons au niveau de certains organes ou tissus, est toujours portée par les molécules originales du DNA injecté, c'est-à-dire, par des molécules qui ont gardé intactes leurs structures primaire et secondaire et la même composition en bases.

---

(+) Ainsi McINDOE et DAVIDSON (1952), PAYNE, KELLY et ENTENMAN (1952) ont montré que la présence d'une tumeur ou d'un foetus en croissance exerce un effet marqué sur l'incorporation de <sup>32</sup>P par le DNA d'autres tissus.

2.3 - Recherche de la nature des molécules radioactives. Etude de l'intégrité des structures primaire et secondaire par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium.

Comme le DNA que nous injectons a une densité différente du DNA endogène des animaux, nous avons utilisé l'ultracentrifugation en gradient de CsCl pour étudier la nature des molécules radioactives retrouvées au niveau des différents organes ou tissus.

Nous avons utilisé des DNA de densités différentes :

- E.coli-<sup>3</sup>H :  $\rho = 1.710$  g/ml
- B.subtilis et E.coli tritiés et alourdis à l'oxyde de deutérium, respectivement  $\rho = 1.728$  g/ml et  $\rho = 1.736$  g/ml.

Graphique 60 - Ovaires et embryons de souris en gestation, injectées de 60  $\mu$ Ci de thymidine-<sup>3</sup>H (activité spécifique 1 Ci/mM) et sacrifiées 1 heure après l'injection. On peut voir que la courbe de radioactivité se superpose parfaitement à la courbe des densités optiques. En dehors de la courbe de radioactivité, on n'observe pas de radioactivité satellite supérieure au bruit de fond normal.

Graphique 61 - Organes génitaux de souris impubères traitées au benzoate d'oestradiol.

Après 30 heures d'hyperplasie, les animaux sont injectés par voie intraveineuse de 100  $\mu$ g de DNA-<sup>3</sup>H de E.coli. Ils sont sacrifiés 36 heures après l'injection. Dans le cas des ovaires, 100 % de la radioactivité sont portés par des molécules qui sédimentent en position du DNA de E.coli.



Dans le cas du vagin, seule une petite quantité de radioactivité correspond à du DNA de E.coli intact. Dans le cas de l'utérus, toute la radioactivité sédimente en position du DNA endogène. Dans ce cas, le DNA de E.coli a été dégradé et les produits d'hydrolyse ont servi à la synthèse de DNA de souris.

Graphique 62 - Organes génitaux de souris impubères traitées au benzoate d'oestradiol.

Après 29 heures d'hyperplasie, les animaux sont injectés par voie intraveineuse de 200 µg de DNA tritié et deutéré de B.subtilis. Ils sont sacrifiés 1 heure après l'injection.

Dans les trois organes (ovaires, vagin et utérus) on retrouve en quantité variable de la radioactivité qui est portée par des molécules qui sédimentent en position du DNA deutéré de B.subtilis.

Graphiques 63- et 64- Organes génitaux, tumeur et intestin de souris porteuses d'un carcinome mammaire spontané, injectées par voie intraveineuse de 90 µg de DNA-<sup>3</sup>H et D<sub>2</sub>O de E.coli. Les animaux ont été sacrifiés 2 heures après l'injection. Dans tous les organes (ovaires, vagin, utérus et tumeur) on retrouve des quantités variables de radioactivité portées par des molécules qui sédimentent en position du DNA-<sup>3</sup>H et D<sub>2</sub>O de E.coli.

Tableau récapitulatif 67

(+) Ont été considérés comme positifs les résultats où une quantité importante de DNA étranger a été retrouvée.

Organe examiné		Quantité injectée µg	DNA injecté	Temps écoulé après l'injection	Résultats (+)
Souris en gestation :	Ovaires	150	B.subtilis- <sup>3</sup> H D <sub>2</sub> O	60 min	+
	Embryons	150	"	60 min	+
	"	200	"	60 min	+
	"	150	"	60 min	+
	Ovaires	100	E.coli- <sup>3</sup> H	60 min	+
Souris porteuses d'un carcinome spontané :	Tumeur	82	E.coli- <sup>3</sup> H	60 min	+
	"	82	"	24 h	+
	"	82	"	48 h	+
	Ovaires	82	"	24 h	0
	"	82	"	48 h	0
	Tumeur	90	E.coli- <sup>3</sup> H D <sub>2</sub> O	2 h	+
	Ovaires	90	"	2 h	+
	Vagin	90	"	2 h	+
	Utérus	90	"	2 h	+
	Intestin	90	"	2 h	0
	Ovaires	90	"	48 h	+
	"	90	"	96 h	+
	Tumeur	90	"	48 h	0
	"	90	"	96 h	0
	Utérus	90	"	2 h	0
	"	90	"	48 h	0
	"	90	"	96 h	0
	Vagin	90	"	2 h	+
	Intestin	90	"	2 h	0
	Tumeur	60	E.coli- <sup>3</sup> H	60 min	+



Tableau récapitulatif 67 (suite)

Organe examiné		Quantité injectée	DNA injecté	Temps écoulé après l'injection	Résultats (+)
		µg			
Souris	Ovaires	80	E.coli- <sup>3</sup> H D <sub>2</sub> O	2 h	+
impubères	"	80	"	16 h	0
traitées au	"	80	"	40 h	0
benzoate	Utérus	80	"	2 h	0
d'oestradiol	"	80	"	16 h	0
	"	80	"	40 h	0
	Vagin	80	"	2 h	+
	"	80	"	16 h	+
	"	80	"	40 h	+
	Intestin	80	"	2 h	0
	"	80	"	16 h	0
	"	80	"	40 h	0
	Ovaires	100	E.coli- <sup>3</sup> H	1 h	+
	"	100	"	12 h	+
	"	100	"	36 h	+
	Vagin	100	"	1 h	+
	"	100	"	12 h	+
	"	100	"	36 h	+
	Utérus	100	"	1 h	0
	"	100	"	12 h	0
	"	100	"	36 h	0
	Ovaires	100	"	60 min	+
	"	200	B.subtilis- <sup>3</sup> H D <sub>2</sub> O	60 min	+
	Utérus	200	"	60 min	+
	Vagin	200	"	60 min	+
	Ovaires	80	E.coli- <sup>3</sup> H	60 min	+
	Vagin	80	"	60 min	0
	Utérus	80	"	60 min	0
Souris normales adultes :	Ovaires	150	B.subtilis- <sup>3</sup> H D <sub>2</sub> O	60 min	+
	Vagin	150	"	60 min	0
	Utérus	150	"	60 min	0
	Ovaires	450	E.coli- <sup>3</sup> H D <sub>2</sub> O	60 min	+
	Vagin	150	"	60 min	0

Tableau 68

Bilan des expériences reprises au Tableau récapitulatif

Organes (+)		Temps écoulé : après l'injection du DNA	Nombre d'expériences	Nombre d'expériences positives
Souris en gestation	Ovaires	60 min	2	2
	Embryons	60 min	3	3
Souris porteuses d'un carcinome mammaire spontané	Tumeur	60 min	2	2
		120 min	1	1
		> 120 min	4	2
	Ovaires	120 min	1	1
		> 120 min	4	2
	Vagin	120 min	2	2
	Utérus	120 min	2	1
> 120 min		2	0	
Intestin	120 min	2	0	
Souris impubères traitées au benzoate d'oestradiol	Ovaires	60 min	3	3
		120 min	2	2
		> 120 min	4	2
	Utérus	60 min	2	1
		120 min	2	0
		> 120 min	4	0
	Vagin	60 min	2	1
		120 min	2	2
		> 120 min	4	4
	Intestin	60 min	1	0
120 min		1	0	
> 120 min		2	0	
Souris normales adultes	Ovaires	60 min	2	2
	Vagin	60 min	2	0
	Utérus	60 min	1	0

(+) Lors de chaque expérience, les échantillons examinés provenaient du pool des organes de 3 animaux injectés (6 dans le cas des souris impubères).



Graphique 65 - Ovaires de souris porteuses d'un carcinome mammaire spontané, injectées de 90 µg de DNA-<sup>3</sup>H et D<sub>2</sub>O de E.coli.

Les animaux ont été sacrifiés 2, 48 et 96 heures après l'injection.

Dans les trois cas, on retrouve de la radioactivité portée par des molécules qui sédimentent à une densité différente de celle du DNA de souris.

Graphique 66 - Vagins de souris injectées de 90 µg de DNA-<sup>3</sup>H et D<sub>2</sub>O de E.coli et sacrifiées 2, 16 et 40 heures après l'injection.

On peut voir qu'après 16 et 40 heures, il persiste dans l'organe, une petite quantité de molécules de DNA qui sédimentent en même position que le DNA injecté.

Le Tableau 67 est un tableau récapitulatif de toutes les expériences où les DNA isolés à partir des organes ont été soumis à l'ultracentrifugation en gradient de CsCl.

A partir du Tableau 68, qui dresse un bilan de ces expériences, on peut voir que<sup>(+)</sup>:

- chez les souris en gestation, dans les ovaires et les embryons, nous avons retrouvé, 60 minutes après l'injection, du DNA exogène intact.

---

(+) Il faut, en plus, tenir compte de ce que les échantillons de DNA examinés avaient été extraits du "pool" des organes de 3 animaux injectés (6 dans le cas des souris impubères).

- chez les souris porteuses d'un carcinome mammaire spontané,  
la recherche de DNA exogène intact a été positive 60 et 120 minutes après l'injection ; dans la tumeur, les ovaires, le vagin et l'utérus (1 cas sur 2).  
Aux temps plus longs (24 et 96 heures) cette recherche a été positive dans la tumeur et les ovaires. Elle a été négative dans l'utérus.
  
- chez les souris impubères traitées au benzoate d'oestradiol,  
du DNA exogène peut être retrouvé 60 et 120 minutes après l'injection, dans les ovaires, l'utérus et le vagin ; jamais dans l'intestin.  
Aux temps longs, la présence de DNA exogène a été observée dans les ovaires et le vagin ; jamais dans l'utérus et l'intestin.
  
- chez les souris adultes, on retrouve le DNA exogène 60 minutes après l'injection, dans les ovaires tandis que dans le vagin et l'utérus, on ne retrouve que du DNA endogène radioactif.

#### 2.4 - Localisation cellulaire de la radioactivité par autoradiographie

Par ultracentrifugation en gradient de CsCl, nous avons vu que du DNA-<sup>3</sup>H exogène est retrouvé dans certains organes, même à des temps longs après l'injection.

Il était très important de savoir où se localise, dans les cellules des tissus ou organes, la radioactivité portée par ces molécules de DNA exogène.

Lors de certaines expériences, des aliquotes de tissus ont été prélevées et traitées pour l'autoradiographie selon la technique décrite au chapitre "Méthodes".

Après un mois d'incubation, les lames ont été développées, colorées à l'hématoxyline Harris et différenciées à l'érythroisine.

Photo 3 - Ovaire de souris porteuse d'un carcinome mammaire spontané, injectée de 82 µg de DNA-<sup>3</sup>H de E.coli et sacrifiée 48 heures après l'injection.

Photos 4 - Carcinome mammaire spontané de souris injectées de  
et 5 - 82 µg de DNA-<sup>3</sup>H de E.coli et sacrifiées 1 et 48 heures après l'injection.

La radioactivité est portée par des molécules de DNA qui sédimentent en position du DNA de E.coli et aussi par d'autres qui sédimentent en position du DNA de souris (Fig.69).

Photo 6 - Ovaire de souris impubère traitée au benzoate d'oestradiol, injectée après 40 heures d'hyperplasie de 100 µg de DNA-<sup>3</sup>H de E.coli et sacrifiée 36 heures après l'injection.

Photos 7 - Ovaire de souris impubère traitée au benzoate d'oestradiol et injectée après 30 heures d'hyperplasie de 100 µg  
et 8 - de DNA-<sup>3</sup>H de E.coli et sacrifiée 1 et 36 heures après l'injection.

(Fig.70 - La radioactivité est portée par des molécules qui sédimentent en position du DNA de E.coli).

L'examen microscopique des différentes préparations nous a permis de constater que :

pour les ovaires :

- dans les follicules, de nombreuses cellules sont marquées,
- après 1 heure d'incubation, la radioactivité est superposable au noyau et la localisation après des temps plus longs - 24 et 48 heures - reste nucléaire.
- la radioactivité ne semble pas disparaître, le nombre de cellules marquées après 24 heures est aussi élevé qu'après 1 heure. Après 48 heures, l'intensité du marquage est un peu plus faible et la localisation plus diffuse.
- tous les follicules sont marqués mais, par follicule, le nombre de cellules marquées est différent.
- nous n'avons pas observé d'ovocyte marqué.
- le pourcentage de cellules marquées est moins élevé dans le tissu conjonctif du stroma (Photos 9 et 10).
- les résultats sont très comparables pour les organes provenant de souris porteuses d'un carcinome spontané ou pour les organes de souris impubères traitées au benzoate d'oestradiol et injectées après 40 heures d'hyperplasie ou pour les organes de souris impubères traitées au benzoate d'oestradiol et injectées après 30 heures d'hyperplasie.

pour le tissu tumoral :

- un grand nombre de cellules sont marquées et la radioactivité est localisée sur le noyau.
- des cellules en mitose que nous avons observées, aucune n'était marquée.



- le marquage est plus important au niveau des cellules épithéliales qu'au niveau du tissu conjonctif du stroma (Photos 11 et 12).
- sur les coupes provenant de tissus d'animaux sacrifiés 24 ou 48 heures après l'injection, le marquage est plus diffus et déborde du noyau vers le cytoplasme.

pour le ganglion mésentérique :

- quelques cellules apparaissent bien marquées. Elles sont toutes localisées à la périphérie de l'organe.

pour la glande mammaire :

- de très rares cellules seulement sont marquées.

## DISCUSSION GENERALE

---

Nous avons pu montrer que lorsqu'on injecte du DNA tritié par voie intraveineuse à la souris, ce DNA disparaît rapidement de la circulation sans qu'il y ait apparition d'une quantité importante de petites molécules.

À ce point de vue, nos résultats sont en parfait accord avec ceux de TSUMITA et IWANAGA (1963).

Il semble que le DNA soit très peu attaqué par la DNase plasmatique ; ceci semble être dû au fait que celle-ci se trouve en faible quantité dans le sang de nos animaux et que, d'autre part, le temps de séjour du DNA dans le sang est trop court pour qu'il y subisse une dégradation importante.

En suivant par chromatographie, la cinétique de disparition de la radioactivité nous avons vu que c'est celle qui est portée par les molécules les plus polymérisées qui disparaît le plus rapidement. Comme ces grosses molécules sont responsables de la viscosité, nous pourrions ainsi expliquer les résultats obtenus par GOSSE, LE PECQ, DEFRANCE et PAOLETTI (1965). Ces auteurs observent, en effet, une chute rapide de la viscosité du sang, après injection de DNA, qui ne semble pas due uniquement à l'action d'hydrolases plasmatiques.

Notons ici que WILCZOK et GRABOWSKA (1963) ont étudié le sort du DNA injecté in vivo par voie intrapéritonéale. Ils ont montré que 5 minutes après l'injection de DNA-<sup>3</sup>H ou <sup>14</sup>C, un taux élevé de radioactivité est trouvé dans le sang et que 2 heures après l'injection, une partie de la radioactivité est encore portée par du DNA macromoléculaire.

BENDICH, WILCZOK et BORENFREUND (1965) ont, d'autre part, isolé du sang de souris injectées par voie intrapéritonéale de DNA infectieux (virus polyoma) et de DNA transformant (pneumocoque), des molécules de DNA encore actives biologiquement.

En ce qui nous concerne, nous avons constaté, à l'aide de l'ultracentrifugation en gradient de CsCl, que les molécules radioactives que nous retrouvons ont conservé intactes certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques (même composition en bases et structure bicaténaire).

Il semble donc que du DNA étranger polymérisé, ayant conservé ses structures primaire et secondaire et son activité biologique, puisse résister dans le sang et être véhiculé jusqu'aux différents organes ou tissus de l'organisme.

Il importait, dès lors, de déterminer si les molécules de DNA peuvent pénétrer sous leur état natif dans les cellules et y conserver leur intégrité chimique.

Pour RABOTTI (1963), lorsque du DNA extrait de cellules d'ascite BDF<sub>1</sub>T cultivées in vitro en présence de formate <sup>14</sup>C est injecté à des souris porteuses de la tumeur BDF<sub>1</sub>T, l'activité spécifique des différentes bases du DNA tumoral est la même que celle observée dans les cellules cultivées in vitro. L'auteur en conclut que le DNA marqué in vitro garde dans les cellules-hôtes, ses caractéristiques chimiques originales.

Nous avons, quant à nous, étudié le degré de polymérisation des molécules radioactives retrouvées dans différents organes ou tissus et nous avons vu que, même après des temps relativement longs,

les schémas d'élu-tion chromatographique du DNA isolé à partir de certaines organes, sont les mêmes que celui du DNA injecté. Ces schémas sont, par contre, tout à fait différents de ceux qu'on observe lorsqu'on traite l'animal par des précurseurs radioactifs spécifiques (TdR-<sup>3</sup>H). Il semble donc qu'à partir de ces résultats on peut exclure un processus d'hydrolyse suivi de resynthèse.

Si, dans certains organes, le DNA exogène après avoir été absorbé semble y subsister sans y être modifié, dans d'autres, on assiste à une dégradation importante et au rejet de certains produits d'hydrolyse (ceci expliquerait l'apparition tardive de radioactivité acido-soluble dans le sang).

Nos résultats montrent également que certains organes paraissent particulièrement avides de DNA exogène. C'est le cas des ovaires, vagin, tumeur et embryons.

De plus, dans les organes génitaux des souris impubères, nous observons des phénomènes différents selon le tissu : dans les ovaires et le vagin, nous retrouvons du DNA exogène peu modifié, alors que dans l'utérus, le DNA exogène paraît avoir été hydrolysé entièrement et réutilisé pour une synthèse endogène. Dans ces organes, la fixation du DNA étranger est stimulée par une injection de benzoate d'oestradiol.

Par ces méthodes d'analyse, nous avons accumulé des informations qui permettent de penser que du DNA exogène peut être retenu, non dégradé, par certains organes.

L'autoradiographie nous a permis de localiser cette radioactivité dans les tissus. Nous avons ainsi pu observer que dans les

ovaires, ce sont surtout les cellules folliculaires qui sont marquées et que la radioactivité est localisée au niveau du noyau des cellules. Dans le tissu conjonctif on ne retrouve que peu de cellules marquées. L'image observée est identique lorsque les examens sont faits après des temps longs après l'injection de DNA tritié. Après 24, 36 ou 48 heures, on observe toujours un grand nombre de cellules marquées. La seule différence paraît éventuellement résider dans une localisation un peu plus diffuse de la radioactivité.

Dans la tumeur, on observe également un marquage important des cellules épithéliales, tandis que les cellules du tissu conjonctif apparaissent très peu radioactives.

Le marquage est nucléaire et on observe également une dispersion plus grande de la radioactivité à des temps longs après l'injection.

Dans nos conditions expérimentales, du DNA bactérien après avoir été véhiculé par le sang sans subir de dégradation importante, a pu pénétrer dans le noyau des cellules de certains organes et y conserver son intégrité chimique.

Il semble que nos résultats apportent une base biochimique aux observations biologiques rapportées par d'autres auteurs.

Nous ignorons encore si de tels phénomènes de translation se produisent spontanément dans les organismes vivants non injectés. Une telle translation pourrait cependant fournir une explication biochimique à certaines observations.

BENDICH, WILCZOK et BORENFREUND (1965) suggèrent qu'une translation de DNA libéré à partir de cellules tumorales en nécrose

pourrait contribuer à l'apparition des métastases lors de certains états tumoraux. Du DNA pourrait quitter le foyer principal, être véhiculé par le sang et induire éventuellement la formation de foyers secondaires.

### Perspectives

On sait que l'entrée d'un nouveau DNA dans des cellules, à l'occasion d'une infection virale ou lors de transformation bactérienne, cause des modifications profondes dans les mécanismes normaux de croissance et de biosynthèse. Il a été possible, dans certains cas, de mettre en évidence des protéines nouvelles, des enzymes, des inhibiteurs, etc... dont le DNA étranger avait induit la synthèse.

On pourrait imaginer qu'une déficience biochimique de la cellule : absence d'un enzyme, par exemple, pourrait être corrigée en fournissant un complément génétique approprié sous forme de DNA. Des molécules de DNA porteuses d'un ou plusieurs gènes, isolées d'un organisme qui synthétise une protéine particulière, pourraient être utilisées pour diriger la synthèse de cet enzyme dans un autre organisme.

Un point important reste à préciser : le DNA absorbé a-t-il un effet sur la cellule ?

Cet aspect du problème fera l'objet de nos recherches futures. Quelques observations semblent suggérer déjà des moyens d'approche du problème.

Dans le cas des ovaires, nous voyons que 48 heures après son absorption par la cellule, une partie du DNA étranger est encore présente.

Non seulement il n'a pas été simplement éliminé, mais encore on peut voir, par ultracentrifugation en gradient de CsCl, qu'il se passe quelque chose de nouveau dans la cellule. En effet, après 48 heures, le DNA étranger encore présent a changé de densité et il occupe, en ultracentrifugation, une position à une densité intermédiaire entre le DNA endogène et le DNA injecté.

Peut-être assiste-t-on là au premier stade d'incorporation du DNA étranger dans le génome, ce qui ouvrirait un champ tout nouveau à nos investigations. Notre hypothèse de travail actuelle est que les molécules intermédiaires que nous observons pourraient provenir de l'association d'éléments de DNA endogène et d'éléments de DNA bactérien exogène.

RESUME GENERAL

---

Nous avons étudié successivement :

1. Par une nouvelle méthode de chromatographie, des modifications provoquées du DNA : l'action de la DNase et la dénaturation thermique.

Les résultats obtenus montrent que la chromatographie centrifugée sur pulpe de papier de DEAE-cellulose peut être utilisée pour l'étude des modifications apparaissant dans une population de molécules de DNA soumises à l'action de différents agents physiques ou biologiques.

2. Le sort du DNA injecté à la souris dans le sang.

Nos résultats montrent que du DNA étranger polymérisé, ayant conservé ses propriétés physico-chimiques intactes, peut arriver au niveau des organes ou tissus de l'organisme.

3. Le sort du DNA dans les organes.

En étudiant, par chromatographie, le degré de polymérisation des molécules radioactives retrouvées dans les organes et en étudiant la nature de ces molécules par ultracentrifugation en chlorure de césium, nous avons pu montrer que des molécules de DNA étranger peuvent pénétrer, sous leur état natif, dans les cellules et y conserver leur intégrité chimique.

Certaines observations permettent de penser que le DNA étranger s'intègre dans le génome de la cellule-hôte.



Ces résultats sont discutés en fonction d'observations biologiques d'autres auteurs auxquels ils semblent apporter une base biochimique :

- a) Une translation naturelle pourrait expliquer certains résultats biologiques.
- b) Une translation provoquée de DNA spécifique pourrait corriger des déficiences biochimiques de certaines cellules.

BIBLIOGRAPHIE

---

- AMOS, H. - Biochem. Biophys. Res. Commun., (1961) 5, 1.
- AOUSTAOUROV, B.L., BEDNIAKOVA, T.A., GUINSBOURG, S.L., ZBARSKI, I.B. et RAMENSKAIA, S.P. - Dok. Acad. Nauk. (1960) 134, 449.
- ASCOLI, A. - Z. Physiol. Chem., (1900-1901) 31, 161.
- ATANASIU, P., ORTH, G., REBIERE, J.P., BOIRON, M. et PAOLETTI, C. - C.R. Acad. Sci. (1962) 254, 4228.
- AVERY, O.T., McLEOD, C.M., McCARTY, M. - J. Exptl. Med. (1944) 79, 137.
- BASERGA, R., et KISIELESKI, W.E. - Arch. Ital. Pat. Clin. Tumori (1963) 6, 3.
- BEARN, J.G. et KIRBY, K.S. - Exptl. Cell Res. (1959) 17, 547.
- BEATTY, R.A. et BILLET, F.S. - Proc. Roy. Soc. Edinburgh (Sect. B) (1961) 68, Part. 1, 83.
- BENDICH, A. - Dis. New Syst. (1961) 22/4 (II), 9.
- BENDICH, A., FRESCO, J.R., ROSENKRANZ, M.S. et BELSER, S.M. - J. Amer. Chem. Soc. (1955) 77, 3671.
- BENDICH, A., WILCZOK, T. et BORENFREUND, E. - Science (1965) 148, 374.
- BENOIT, J. - Strasbourg Medical (1957) 11, 875.
- BENOIT, J., LEROY, P., VENDRELY, R. et VENDRELY, C. - Zootec. e Vet. (1957a) 12, 328.
- BENOIT, J., LEROY, P., VENDRELY, C. et VENDRELY, R. - C.R. Acad. Sci. (1957b) 244, 2320.
- BENOIT, J., LEROY, P., VENDRELY, C. et VENDRELY, R. - C.R. Acad. Sci. (1957c) 245, 448.
- BENOIT, J., LEROY, P., VENDRELY, R. et VENDRELY, C. - Presse Médic. (1957d) 65, 1623.
- BENOIT, J., LEROY, P., VENDRELY, C. et VENDRELY, R. - C.R. Acad. Sci. (1958) 247, 1049.
- BENOIT, J., LEROY, P., VENDRELY, C. et VENDRELY, R. - C.R. Acad. Sci. (1959a) 248, 2519.
- BENOIT, J., LEROY, P., VENDRELY, C. et VENDRELY, R. - C.R. Acad. Sci. (1959b) 248, 2646.

- BENOIT, J., LEROY, P., VENDRELY, C. et VENDRELY, R. - C.R.Acad.Sci. (1960a) 250, 211.
- BENOIT, J., LEROY, P., VENDRELY, R. et VENDRELY, C. - Biochem.Pharmacol. (1960b) 4, 181.
- BENOIT, J., LEROY, P., VENDRELY, R. et VENDRELY, C. - Trans. New York Acad.Sci. (1960c) 22, 494.
- BENSCH, K.G., SIMBONIS, S., HILL, R.B. et KING, D.N. - Nature (1959) 183, 477.
- BENSCH, K.G. et KING, D.N. - Science (1961) 133, 382.
- BILLETT, F.S., HAMILTON, L. et NEWTH, D.R. - Heredity (1964) 19, 259.
- BODNER, W. et SCHILDKRAUT, C. - Analyt.Biochem. (1964) 8, 229.
- BOGATYREVA, S.A., SNAMENSKAYA, M.P., KUSHNER, K.F., MOISEYEVA, I.G. et TOLOKONNIKOVA, F.V. - Dokl.Akad.Nauk.SSSR (1961) 136, 65.
- BOIRON, M., PAOLETTI, C., THOMAS, M., REBIERE, J.P. et BERNARD, J. - C.R.Acad.Sci. (1962) 254, 2097.
- BOIRON, M., LEVY, J.P. et THOMAS, M. - Ann.Inst.Pasteur (1965) 108, 298.
- BOIVIN, A., VENDRELY, R. et VENDRELY, C. - C.R.Acad.Sci. (1948) 223, 1061.
- BOIVIN, A., VENDRELY, R. et TULASNE, R. - Coll.Intern.du C.N.R.S.(1949) 8, 67.
- BORENFREUND, E., ROSENKRANZ, H.S. et BENDICH, A. - " The Kinetics of Cellular Proliferation". F.Stohlman, éd. Greene & Stratton, New York and London (1959).
- BORENFREUND, E. et BENDICH, A. - J.Biophys.Biochem.Cytol. (1961) 9, 81.
- BRACHET, J. - Arch.Biol. (1933) 44, 519.
- BRACHET, J. - Quart.J.Micr.Sci. (1953) 94, 1.
- BRATAVOV, K. - Isv.Akad.Nauk, SSSR, Seria Biol. N°1 (1954) 53.
- BRYANT, B.J. - J.Cell Biol. (1963) 18, 515.
- BURTON, K. - Biochem.J. (1958) 62, 315.
- BUSCHINELLI, A. - World's Poultry Sci.J. (1962) 18, 246.
- CHARLES, P. et LEDOUX, L. - J.Chromatogr. (1966) 25, 135.
- CHORAZY, M. - Acta Unio Intern.Contra Cancrum (1962) 18, 244.

- CHORAZY, M.R., BALDWIN, H.H. et BOUTWELL, R.K. - Fed.Proc. (1960) 19, 307.
- CHORAZY, M. et BENDICH, A. - J.Cell Biol. (1963) 19, 71.
- CILINGARJAN, A.A., PAVLOV, E.F. et MAGAKJAN, J. - Agrobiologia (1960) 6, 903.
- CLARKE, J.L. - Phil.Trans.Roy.Soc. (1851) 141, 607.
- CONOLLY, J.H., HERRIOTT, R.M. et GUPTA, S. - Brit.J.Exptl.Pathol., (1962) 43, 392.
- CRESTFIELD, A.M., SMITH, K.C. et ALLEN, S.W. - J.Biol.Chem. (1955) 216, 185.
- CRONKITE, P.E., BOND, V.P., FLENDER, T.M. et RUBINI, R.J. - Labor.Invest. (1959) 8, 263.
- DAVILA, C., CHARLES, P. et LEDOUX, L. - J.Chromatogr. (1965a) 19, 382.
- DAVILA, C., CHARLES, P. et LEDOUX, L. - J.Chromatogr. (1965b) 19, 396.
- DE DEKEN-GRENSON, M. et DE DEKEN, P.H. - Biochim.Biophys.acta (1959) 31, 195.
- DETRE, K.D. et FINCH, S.C. - Science (1958) 129, 656.
- DI MAYORCA, G.A., EDDY, B.E., STEWART, S.E., HUNTER, W.S., FRIEND, C. et BENDICH, A. - Proc.Nat.Acad.Sci., U.S.A. (1959) 45, 1805.
- DISCHE, Z. - Mikrochemie (1930) 8, 4.
- DJORDJEVIC, O., KOSTIC, L. et KANAZIR, D. - Nature (1962) 195, 614.
- DULBECCO, R. - Cancer Res. (1961) 21, 975.
- DULBECCO, R. et VOGT, M. - Proc.Natl.Acad.Sci. (1960) 46, 1617.
- DUMONT, A.E., AYVAZIAN, J.H. et McCLUSKEY, R.T. - Nature (1962) 194, 193.
- EIGNER, J. et DOTY, P. - J.Mol.Biol. (1965) 12, 549.
- ELIAS, H.G. - "Méthodes de l'ultracentrifugation analytique", Beckman Edition (1961) 260.
- FAHMY, O.G. et FAHMY, M.J. - Nature (1961) 191, 776.
- FAHMY, O.G. et FAHMY, M.J. - Nature (1962) 196, 873.
- FAHMY, O.G. et FAHMY, M.J. - Proc. 11th Intern.Congr.Genet.(Abstr.) (1963) 1, 65.
- FAHMY, O.G. et FAHMY, M.J. - Nature (1964) 204, 46.

- FAHMY, O.G. et FAHMY, M.J. - Genetics (1965a) 52, 861.
- FAHMY, O.G. et FAHMY, M.J. - Nature (1965b) 207, 507.
- FEULGEN, R., BEHRENS, M. et MAHDIAUSSAN, S. - Z.Physiol. (1937) 246, 203.
- FICHTELIUS, K.E. et GROTH, O. - Nature (1963) 200, 587.
- FICQ, A. - Monographie N°9 (Institut Interuniversitaire des Sciences nucléaires, Bruxelles).
- FICQ, A. - "The Cell", J.Brachet et A.E.Mirsky, Academic Press, Inc. New York (1959) 67.
- FLOERSHEIM, G.L. - Nature (1962a) 193, 1266.
- FLOERSHEIM, G.L. - Experientia (1962b) 18, 328.
- FRASER, D. et JERREL, E.A. - J.Biol.Chem. (1953) 205, 291.
- FREDERIC, J. et CORIN-FREDERIC, J. - C.R.Soc.Biol. (1962) 156, 742.
- GARTLER, S.M. - Nature (1959) 184, 1505.
- GARTLER, S.M. - Biochem.Biophys.Res.Communic. (1960) 3, 127.
- GERBER, G.B. et REMY-DEFRAIGNE, J. - Int.J.Rad.Biol. (1966) 10, 141.
- GIMLIN, D.L., FARQUARSON, E. et LEACH, F.R. - Nature (1963) 197, 407.
- GOSSE, Ch., LE PECQ, J.B., DEFRANCE, P. et PAOLETTI, C. - Cancer Res. (1965) 25, 877.
- GRIFFITH, F. - J.Hyg.Camb. (1935) 35, 23.
- GROMOV, A.M. et FEOKTISTOV, P.I. - Ptitsevodstvo (1956) 5, 42.
- GROMOV, A.M. et FEOKTISTOV, P.I. - Ptitsevodstvo (1958) 25, 133.
- GROMOV, A.M. et FEOKTISTOV, P.I. - Ptitsevodstvo (1959) 9, 26.
- GROMOV, A.M. et POLETSKII, V.A. - Zhivotnovodstvo (1962) 10, 83.
- HAREL, L., HAREL, J., BOER, A., IMBENOTTE, J. et CARPENI, N. - Biochim. Biophys.Acta (1964) 87, 212.
- HERRIOTT, R.M. - Science (1961) 134, 256.
- HERRIOTT, R., CONOLLY, J.H. et GUPTA, S. - Nature (1961) 189, 817.
- HERSHEY, A.D. et CHASE, M. - J.Gen.Physiol. (1952) 36, 39.
- HILL, M. - Exptl.Cell Res. (1961a) 24, 405.

- HILL, M. - Nature (1961b) 189, 916.
- HILL, M. - Exptl. Cell Res. (1962) 28, 21.
- HILL, M. et DRASIL, V. - Exptl. Cell Res. (1960) 21, 569.
- HILL, M. et JAKUBICKOVA, J. - Exptl. Cell Res. (1962) 26, 541.
- HINRICHS, H.R., PETERSEN, R.O. et BASERGA, R. - Arch. Pathol. (1964) 78, 245.
- HOTCHKISS, R.D. - Coll. Intern. C.N.R.S. (1949) 8, 57.
- HUDNIK-PLEVNIK, T.A., GLISIN, V.R. et SIMIC, M.M. - Nature (1959) 184, 1818.
- HUTCHINSON, W.C. et MUNRO, H.N. - The Analyst (1961) 86, 768.
- INGLE, D.T. - Exptl. Med. Surg. (1949) 7, 34.
- ITO, Y. - Virology (1960) 12, 596.
- ITO, Y. - Proc. Natl. Acad. Sci. (1961) 47, 1897.
- ITO, Y. et EVANS, C.A. - J. Exptl. Med. (1961) 114, 485.
- JEENER, R. - Biochim. Biophys. Acta (1948) 2, 439.
- JULLIEN, P. - Rev. Fr. Et. Clin. Biol. (1962) 7, 304.
- KANAZIR, D., PANJEVAC, B., CECUK, O., RISTIC, G. et KRAINCANIC, B. - Radiat. Res. (1958) 9, 137.
- KANAZIR, D., BECKAREVIC, A., PANJEVAC, B., SIMIC, M. et RISTIC, G. - Bull. Inst. Nucl. Sci. (1959) 9, 149.
- KARPFEL, Z., PALECEK, E. et SLOTOVA, J. - Second Intern. Congr. of Rad. Res. Abstr. of papers (1962) 148.
- KARPFEL, Z., SLOTOVA, J. et PALECEK, E. - Exptl. Cell Res. (1963) 32, 147.
- KAY, E.R.H., SIMMONS, N.S. et DOUNCE, A.L. - J. Amer. Chem. Soc. (1952) 74, 1724.
- KAY, E.R.M. - Nature (1961) 191, 387.
- KELLY, L.S., PAYNE, A.H., WHITE, M.R. et JONES, H.B. - Cancer Res. (1951) 11, 694.
- KING, D.W. et BENSCH, K.G. - Fed. Proc. (1960) 19, 308.
- KOK, I.P. - Dopovidi Akad. Nauk, SSSR (1959) 121, 921.
- KOSIN, I.L., KATO, M. et WEISBROTH, S.M. - Rev. Genetics Soc. America (1961) 81.

- KOSSEL, A. - Z. Physiol. Chem. (1879) 2, 284.
- KOSSEL, A. - Z. Physiol. Chem. (1888) 12, 241.
- KOSSEL, A. et NEUHLANN, A. - Ber. (1894) 27, 2215.
- KOSSEL, A. et STENDEL, H. - Z. Physiol. Chem. (1902-1903) 37, 177.
- KRAUS, I.M. - Nature (1961) 192, 1055.
- KUSHNER, H.F. - Proc. Int. Gen. Symp. (Tokyo) (1956) 515.
- KUSHNER, H.F. - Agrobiologia (1957) 1, 19.
- KUSHNER, H.F. - Proc. Int. Congr. Genet. Montréal (1958) 155.
- KUSHNER, H.F., TOLOKONNIKOVA, E.V. et MOISEYEVA, I.G. - Dokl. Akad. Nauk, SSSR (1959) 129, 674.
- KUSHNER, H.F., TOLOKONNIKOVA, E.V. et MOISEYEVA, I.G. - Trudy Inst. Genet. Akad. Nauk, SSSR (1960) 27, 145.
- KUSHNER, H.V., TOLOKONNIKOVA, E.V., MOISEYEVA, I.G., BOGATYREVA, S.A. et SNAMENSKAYA, M.P. - Trudy Inst. Genet. Akad. Nauk, SSSR (1961), 28, 350.
- LA PEYRAC, F. - Rev. Fr. Et. Clin. Biol. (1963) 8, 195.
- LATARJET, R., REBEYROTTE, N. et MOUSTACCHI, R. - C.R. Acad. Sci. (1958) 246, 853.
- LEDOUX, L. et CHARLES, P. - Arch. Intern. Physiol. Biochim. (1961) 69, 751.
- LEDOUX, L., DAVILA, C., HUART, R. et CHARLES, P. - Proc. Conf. Methods Prep. and Storage of Marked Molecules (1963a) 1123.
- LEDOUX, L., GERBER, G.B. et CHARLES, P. - Arch. Intern. Physiol. Biochim. (1963b) 71, 311.
- LEDOUX, L., CHARLES, P. et DAVILA, C. - Arch. Intern. Physiol. Biochim. (1963c) 71, 820.
- LEDUC, E.H. - J. Biophys. Biochem. Cytol. (1961) 10, 437.
- LEROY, P. - C.R. Acad. Sci. (1962a) 254, 756.
- LEROY, P. - Bull. Biol. France et Belgique (1962b) 96, 229.
- LEROY, P. - Biol. Méd. (1963) 52, 402.
- LEROY, P. et BENOIT, J. - C.R. Acad. Sci. (1963) 256, 4501.
- LEROY, P., BENOIT, J., VENDRELY, R. et VENDRELY, C. - C.R. Acad. Sci. (1964) 258, 1905.

- LEROY, P. et BENOIT, J. - C.R. Acad. Sci. (1966) 262, 805.
- LEUCHTENBERGER, C., LEUCHTENBERGER, R. et UYEKI, E. - Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. (1958) 44, 700.
- LEVENE, P.A. - Z. Physiol. Chem. (1902-1903) 37, 402.
- LIBINSON, R.E., KONSTANTINOVA, V.V., MUKSINOVA, K.N., POPOVA, T.G. et ROGACHEVA, S.A. - Radiobiologiya (1963) 111.
- LOWRY, O.K., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J. - J. Biol. Chem. (1951) 193, 265.
- LUTSHNIK, N.V. - Biochimiya (1958) 23, 146.
- McINDOE, W.M. et DAVIDSON, J.N. - Brit. J. Cancer (1952) 6, 200.
- MAISIN, J., DUMONT, P. et DUNJIC, A. - Nature, (1960) 186, 487.
- MARMUR, J. et DOTY, P. - Nature (1959) 183, 1427.
- MARMUR, J. - J. Mol. Biol. (1961) 3, 208.
- MARMUR, J. et SCHILDKRAUT, C.L. - Nature (1961) 189, 636.
- MARTINOVITCH, P.N., KANAZIR, D.T., KNEZEVITCH, Z.A. et SIMITCH, M.M. - C.R. Acad. Sci. (1961) 253, 1854.
- MARTINOVITCH, P.N., KANAZIR, D.T., KNEZEVITCH, Z.A. et SIMITCH, M.M. - J. Embryol. Exp. Morph. (1962) 10, 167.
- MAZIA, D. - Growth (1949) 15, suppl. 5.
- MEIZEL, S. et KAY, E.R.M. - Biochim. Biophys. Acta (1965) 103, 431.
- MEIZEL, S. et KAY, E.R.M. - Biochim. Biophys. Acta (1966) 123, 34.
- MEJBAUM, W. - Z. Physiol. Chem. (1939) 258, 117.
- MESELSON, M., STAHL, F.W. et VINOGRAD, J. - Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. (1957) 43, 581.
- MIESCHER, F. - " Die histochemischen und physiologischen Arbeiten " (1897), Leipzig.
- MILETIC, B., PETROVIC, D. et ZALEC, Lj. - Nature, (1963) 197, 90.
- MILLER, L.L., BLY, C.G., WATSON, M.L. et BALE, W.F. - J. Exptl. Med. (1951) 94, 431.
- MUNRO, H.N. et FLECK, A. - The Analyst (1966) 91, 78.
- NOVIKOV, B.G., CHEPINOVA, O.P. et LYUBARSKAYA, M.A. - J. Biol. Gén. Acad. Sci., Moscou (1961) 22, 317.



- ORTH, G., ATANASIU, P., BOIRON, M., REBIERE, J.P. et PAOLETTI, C. - Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (1964) 115, 1090.
- PANJEVAC, B. et KANAZIR, D. - Proc.Second U.N.Intern.Conf.Peaceful Uses of Atomic Energy, Geneva (1958) 23, 64.
- PAOLETTI, C., REBIERE, J.P., AUBIN, G. et TUBIANA, M. - Rev.Fr.Et.Clin. Biol. (1964) 9, 950.
- PAYNE, A.H., KELLY, L.S. et ENTENMAN, C. - Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (1952) 81, 698.
- PELC, S.R. - Int.J.Appl.Rad.Isot. (1956) 1, 172.
- PELC, S.R. - Biophysics postgraduate course, King's Coll., London.
- PENIONZKEVITCH, E.F. et MISIN, G.A. - Ptitsevodstvo (1959) 9, 32.
- PERRY, T.L. et WALKER, D. - Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (1958) 99, 717.
- PICCARD, J. - Ber (1874) 7, 1714.
- PIKO, L. et SUSCHKA, A. - Allattenyesztes (1955) 4, 373.
- PIKO, L. et SUSCHKA, A. - Hung.Agr.Rev. (1956) 6.
- PODGAYETSKAYA, D.J., BRESLER, V.M. et OLENOV, Y.M. - Cytologia (1959) 4, 59.
- PODGAYETSKAYA, D.J., BRESLER, V.M. et OLENOV, Y.M. - Abstr.of papers, VIIIth Int.Cancer Congress, Moscow (1962) 139.
- PODGAYETSKAYA, D.J., BRESLER, V.M., SURIKOV, I.M., IGNATOVA, T.N. et OLENOV, J.M. - Biochim.Biophys.Acta (1964) 80, 110.
- POPOVIC, A., BECAREVIC, A., KANAZIR, D., STOSIC, N. et PENTIC, V. - Nature (1963) 198, 165.
- QUATREFAGES, H. et SABATIER, G. - Cour.Avicole (1961) 188.
- RABOTTI, G.F. - Exptl.Cell Res. (1963) 31, 562.
- RIEKE, W.O. - J.Cell Biol., (1962) 13, 205.
- RIVIERE, M.R., VENDRELY, R., CHOUROULINKOV, I., VENDRELY, C. et GUERIN, M. Bull.Ass.Franç.Cancer (1960) 41, 254.
- RIVIERE, M.R., VENDRELY, R., CHOUROULINKOV, I., VENDRELY, C. et GUERIN, M. Rev.Fr.Et.Clin.Biol. (1962) 7, 956.
- SAVKOVIC, N. - Nature (1963) 200, 1073.
- SCHIMIZU, T., KOYAMA, S. et IWAFUCHI, M. - Biochim.Biophys.Acta (1962) 55, 795.

- SCHIMIZU, T. et IMAFUCHI, M. - Biochim. Biophys. Acta (1962) 61, 838.
- SCHMIDT, F., HUBER, R. et CONTELLE, A. - Acta Biol. Méd. (1959) 3, 624.
- SCHMIDT, G. et THANNHAUSER, S. J. - J. Biol. Chem. (1945) 161, 83.
- SCHNEIDER, W. C. - J. Biol. Chem. (1945) 161, 293.
- SCHOFFNER, R. N., BURGER, E. R., ROBERTS, C. W. et LEIGHTON, A. T. - J. Heredity (1961) 52, 105.
- SCHULTZ, J. et CASPERSSON, T. - Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1940) 26, 507.
- SEVAG, M. G., LACKMAN, D. B. et SHOLENS, J. - J. Biol. Chem. (1938) 124, 425.
- SIROTNAK, F. M. et HUTCHINSON, D. J. - Biochim. Biophys. Acta (1959) 36, 246.
- SMITH, A. G. et CRESS, H. R. - Labor. Invest. (1961) 10, 898.
- SOPIKOV, P. M. - Priroda (1950) 39, 66.
- SOPIKOV, P. M. - Agrobiologia (1954) 90, 36.
- SOPIKOV, P. M. - Trud. Vsesoiuz. Nauk. Issled. Ptitsev. (1958) 25, 101.
- STOLK, A. - Expérimentia (1961a) 17, 254.
- STOLK, A. - Nature (1961b) 192, 1215.
- STROUN, M., STROUN-GUTTIERES, L., ROSSI-ROESGEN, L., ROSSI, J. et STROUN, J. - Méd. et Hyg. (1958a) 400, 317.
- STROUN, J., STROUN-GUTTIERES, L., ROSSI, J. et STROUN, M. - Proc. Xth. Intern. Congr. of Genetics (1958b) 11.
- STROUN, J., STROUN-GUTTIERES, L., ROSSI, J. et STROUN, M. - C. R. Acad. Sci. (1962a) 255, 781.
- STROUN, J., STROUN-GUTTIERES, L., ROSSI, J. et STROUN, M. - C. R. Acad. Sci. (1962b) 255, 1030.
- STROUN, J., STROUN-GUTTIERES, L., ROSSI, J. et STROUN, M. - Arch. des Sciences (1963a) 16, 247.
- STROUN, J., STROUN-GUTTIERES, L., ROSSI, J. et STROUN, M. - Biol. Méd. (1963b) 52, 413.
- SUNG, S. C. et QUASTEL, J. H. - Nature (1963) 200, 781.
- SVOBODA, A. - Pol'nobrosnodaretvo, Bratislava (1959) 6, 45.
- SVOBODA, J. et HASKOVA, V. - Folia Biol. Prague (1959) 5, 402.
- SZYBALSKA, E. H. et SZYBALSBY, W. - Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. (1962) 48, 2026.

- SZYBALSKY, W., SZYBALSKA, H. et RAGNI, G. - Natl. Cancer Inst. Monogr. (1961) 7, 75.
- TAYLOR, H.E. - Coll. Intern. C.N.R.S. (1949) 8, 45.
- THOMAS, R., STEINERT, M., GOTHIE, S. et BRACHET, J. - Experientia (1952) 8, 18.
- TIGYI, A., BENEDECZKY, I. et LISSAK, K. - Acta Biol. Sci. Hung. (1959) 10, 197.
- TOLNAI, S., SCANTLAND, R. et MORGAN, J.F. - Nature (1962) 193, 591.
- TOLOKONNIKOVA, E.V. et MOISEYEVA, I.G. - Inst. Gen. Mosc. (1958) 24, 372.
- TOLOKONNIKOVA, E.V., MOISEYEVA, I.G. et BOGATYREVA, S.A. - Z. Obsc. Biol. (1961) 22, 66.
- TRUHAUT, R., DELACROIX, E. et PAOLETTI, C. - Nature (1965) 205, 806.
- TSUMITA, T. et IWANANGA, M. - Nature (1963) 198, 1088.
- VENDRELY, R. - Bull. Soc. Chimie Biol. (1950) 32, 428.
- VENDRELY, R. et VENDRELY, C. - Experientia (1948) 4, 434.
- VENDRELY, R. et VENDRELY, C. - Experientia (1949) 5, 327.
- VOGT, M. et DULBECCO, R. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1960) 46, 365.
- WEIL, R. - Virology, (1961) 14, 46.
- WILCZOK, T. - Neoplasma (1961) 8, 5.
- WILCZOK, T. - Postepy Mikrobiologii (1962a) 1, 103.
- WILCZOK, T. - Neoplasma (1962b) 9, 369.
- WILCZOK, T. - Nature (1962c) 196, 1314.
- WILCZOK, T. et GRABOWSKA, M. - Neoplasma (1963) 10, 343.
- WILCZOK, T. et MENDECKI, J. - Int. J. Rad. Biol. (1965) 9, 201.
- YOON, C.H. - J. Heredity (1964) 55, 163.
- YOON, C.H. et SABO, J. - Exptl. Cell Res. (1964) 34, 599.
- ZAMENHOF, S., ALEXANDER, H.E. et LEIDY, G. - J. Exptl. Med. (1953) 98, 373.