

Recollections on the origins of molecular biology

Jean Brachet [†]

Université Libre de Bruxelles, Brussels (Belgium)

on 'Proteines de structure de Szent-Györgyi et thymonucléohistone'
by J. Brachet and R. Jeener
Biochim. Biophys. Acta 1 (1947) 13–20



Jean Brachet

Everyone has heard of Molecular Biology. But how can one define it? In reality, it consists of an ensemble of very diverse disciplines, grown principally from Biochemistry, Biophysics and Genetics, regrouped under a

single name. For the biologist, the object of Molecular Biology is to explain the major enigmas of life by the physical and chemical properties of the macromolecules (nucleic acids and proteins essentially) found in living organisms: this has been achieved for the transmission of hereditary characters by genes, of which we know the intimate nature, and for the way they work; but we are still far from a molecular explanation of the way living organisms reproduce – that is, of understanding the various steps which lead from the egg to the adult, not to mention memory and thought. There is lots to do yet for tomorrow's molecular biologists.

For the biologist, Biology is a noun and molecular an

[†] Professor Jean Brachet died on August 10th, 1988. He was an active member of the Editorial Board of BBA for more than 40 years and contributed enormously to the development of the journal. He was very enthusiastic about contributing an essay to accompany his original article, a plan he was unfortunately unable to carry out. The essay now included is the text of a lecture which Professor Brachet presented at the Academie Royale de Belgique (*Bull. Classe Sci.* 73 (1987) 441–449) and which was kindly translated by Professor M. Errera.

adjective! Few molecular biologists would accept good heartedly this preeminence of Biology on molecules: they are former physicists or chemists and are more interested in the fine structure of macromolecules constituting living organisms than in their biological role. I once asked Sir John Kendrew, who received the Nobel Prize for having unravelled the fine structure of myoglobin: "What distinguishes Biophysics from Molecular Biology?"; his answer was, "Biophysics is everything I am not interested in". However, innumerable substances "without interest" for the molecular biologist (fats, polysaccharides and even humble ions) are of fundamental importance for living organisms: for instance, the entry of cells into division is controlled by an increase of free calcium ions and a rise in intracellular pH.

The interest of molecular biologists centers on nucleic acids and proteins, indispensable to cells from bacteria to man. X-ray diffraction enabled Watson, Crick and Wilkins to elucidate the double-helical structure of deoxyribonucleic acid (DNA); in 1945, Avery and his collaborators had established in a bacterial system that genes were nothing else but DNA molecules. Research by Pauling, Perutz and Kendrew and many others has made known to us the fine structure of innumerable proteins. An intensive collaboration (not to say a stubborn competition) between biochemists and geneticists led to the deciphering of the genetic code. More recently, elegant procedures have led to the isolation of genes in a pure state, determining the sequence of their nucleotides, identifying sequences which control their activity, introducing these genes into bacteria, cells or mammalian eggs and demonstrating their 'expression': this means that they direct the synthesis of the foreign protein they code for, in the cell which has received the gene.

The genetic manipulations have led to an astounding development of biotechnology: bacteria and yeasts are made to produce, in factories, masses of substances important for medicine and agronomy. This has necessitated the creation of companies, with solid investments, capable of patenting and selling their products; it is important for them to acquire 'à prix d'or' scientific counsellors, preferably Nobel Laureates. Biotechnological research tends to escape from universities; these can, however, obtain profitable contracts from private firms, which give jobs to young scientists. But I confess that I prefer to the present-day stereotyped technique the days long since passed when great discoveries (structure of DNA and proteins, 'cracking' the genetic code, etc.) succeeded each other at an astounding rate; it is, however, possible that collaboration between fundamental and applied research will lead to important and unexpected results. At the present time a very ambitious project exists: 'the total sequencing of the human genome'; the dissection, in its minutest details, of all the

DNA of our cells. This is possible, but it will take an enormous amount of time and money (3 billion dollars has been mentioned); opinions are divided on the benefits of this grand project. It should lead to the accurate prenatal diagnosis of all hereditary diseases; but, on account of its enormous cost, it could paralyse other research projects. I personally am not sure that a perfect knowledge of our DNA will be sufficient to explain how a human egg develops into a man. But the initiator of the project, the Nobel Laureate Walter Gilbert, has already founded a company which will sell sequences of human DNA to those interested. I cannot help sharing the cry of indignation of another Nobel Laureate, Jean Dausset: "Man's genetic heritage cannot belong to commercial firms!"

As we have said, it is really difficult to define a science with as many facets as Molecular Biology. Who had the idea to group under the same word research going on in such diverse fields as biochemistry, biophysics, genetics, embryology, cell biology etc...? The question remains debated. Some attribute the invention of the term 'Molecular Biology' between 1930 and 1940 to the British Physicist, W. Astbury; others think the first to use it was Dr. Weaver, one of the directors of the Rockefeller Foundation. This question of priority seems of little importance, for one of our illustrious compatriots, the botanist Leo Errera, published shortly after 1900 a book with the title "Molecular Physiology".

It is generally admitted that the 'coup d'envoi' in modern molecular biology was given by the 'phage group' (M. Delbrück, S. Luria and A. Hershey) in 1955. They had the original idea of analyzing the genetics of bacteriophages, viruses formed of DNA and proteins only; their unique DNA molecule is relatively small, but it contains several genes; it has been possible to study their function and the regulation of their activity (F. Jacob, R. Thomas). There is no doubt that the astounding progress of molecular biology in the sixties was due to the use as experimental material of biological systems (phages and bacteria) much simpler than our cells. This 'reductionist' approach was successful.

Molecular Biology knew its 'prehistoric period' long before the beginning of phage and bacterial work. Lucky circumstances have enabled me to add a few stones to the foundations of the gigantic edifice which was to become Molecular Biology.

In 1927, when still a young medical student, I decided to work in the Laboratory of Embryology of the Medicine Faculty of the Université libre de Bruxelles. I became tempted by research after having listened to the first lesson on Histology given by Pol Gerard: he talked about the cell and taught us that a cell fragment having lost its nucleus could survive for hours without losing its locomotory activities. This seemed inconceivable to me and I wanted to know why removing the nucleus did not cause the immediate death of the cell. Pol Gerard

advised me to work in the laboratory of Albert Brachet, my father. My father avoided any possible difficulty by putting me in the hands of his future successor, Albert Dalcq.

After a few weeks learning techniques, M. Dalcq gave me two subjects, one of which I could choose. My choice was the localization of 'thymonucleic' acid during oogenesis (growth of the oocytes in the maternal organism). This thymonucleic acid was nothing else than thymus DNA. This happy choice of a young student projected him, without anyone expecting it, into the heart of what was to become Molecular Biology. Chromosomes of the oocytes become extremely tenuous during oogenesis and at the time it was thought that they lost their nucleic acid. If that were so, DNA was not a constant constituent of chromosomes and should be disqualified as playing any genetic rôle (it was actually thought that genes were made of proteins). The detection of DNA in cells was possible owing to a recent cytochemical reaction, the Feulgen reaction. My work led to two conclusions: (1) DNA is a constant constituent of chromosomes and could therefore play a genetic role; (2) oocyte cytoplasm has no reserve of DNA detectable by the Feulgen reaction.

These conclusions led me to study in 1931-1932 a related problem: does DNA synthesis occur during egg cleavage, when the fertilized egg divides repeatedly into thousands of cells. The question was disputed, in spite

of the weak interest in nucleic acids of most biochemists (what a change since then!). That was when Jacques Loeb maintained that there was a total synthesis of nucleic acids (at the expense of simple constituents like phosphoric acid, sugars, purine and pyrimidine bases) during embryonic development and when the embryologist E. Godlewski thought that there was actually only a migration into the nuclei of a nucleic acid stocked in the egg cytoplasm during embryogenesis. My observations with the Feulgen stain were of course incompatible with the theory of migration, but my former biochemical determinations of nucleic acid phosphorus and purines showed, on the contrary, that unfertilized eggs do contain an abundant reserve of nucleic acid; there could, therefore, be no synthesis of nucleic acid during cleavage into numerous cells.

This obvious contradiction between cytochemical and biochemical data urged me to spend two summers at the Zoological Station at Roscoff, to determine nucleic acids during development of sea-urchin eggs. To my great astonishment, everyone was right. There is effectively a net DNA synthesis (determined by a very recently described reaction for deoxyribose) during development, but the total quantity of nucleic acids (measured by purine determination) does not change. One important point was obvious from this work: DNA replicates when cells divide, as expected from the possible genetic role of this nucleic acid.



Raymond Jeener and Jean Brachet

Nothing is more stimulating for a research worker than to be trapped in a contradiction: his brain must function actively and he must stop experimenting and try to escape. I had of course read and reread the few pages that books on Biochemistry dedicated to nucleic acids: they all stated that there exist two types of nucleic acid (which was true), thymus nucleic acid in animals and zymonucleic acid in plants. The first one has a mysterious sugar (deoxyribose) the second one a classical pentose (ribose); these two nucleic acids are respectively DNA and RNA. A rash and false generalization had led to the conclusion that DNA was an 'animal' nucleic acid and that RNA was 'vegetal' nucleic acid.

The only way to escape the contradiction was to imagine that sea-urchin eggs had an abundance of a 'vegetal' nucleic acid in their cytoplasm. Could a young student, 22 years old, be so iconoclastic to the point of breaking the dogma of the distinction, accepted by all, between plant and animal nucleic acids? Before doing so, I had the wisdom to consult Joseph Needham, the 'pope' of chemical embryology. My hypothesis appeared so daring to him that he turned to his 'boss', the Nobel Laureate Sir F.G. Hopkins; the wise advice of 'Hoppy' was: "Tell that young man that he should not believe everything he sees written in books; they are full of errors. Let him do the experiments to check his hypothesis."

Which I did: en route for Roscoff, my exams passed! I took with me an apparatus to determine pentoses... in straw...which prompted ironic remarks from my French friends (Ephrussi, Lwoff and Monod). Experiments rapidly showed I was on the right track: sea-urchin eggs did contain large amounts of pentoses, mostly in the form of RNA. These determinations showed that the content of pentoses decreases during development, which led me to the wrong hypothesis of a conversion of RNA into DNA during development (partial synthesis). My error was due to the fact that sea-urchin eggs are covered by a thick mucous matrix which progressively dissolves during development; I was not aware that this matrix had a high content of glucids, which, like pentoses, give furfural (which I was titrating) when hydrolyzed. If I had taken the trouble to remove the matrix of these eggs before starting the experiments, I would have avoided falling into this problem and of proposing a hypothesis which appeared to be wrong as soon as radioactive precursors of both nucleic acids became available. These are the traps a beginner can fall into; at his expense he learns the importance of numerous control experiments. I was, however, not completely wrong, and later demonstrated that conversion of ribose to deoxyribose is necessary in sea-urchin eggs (as elsewhere) for DNA replication, but this conversion takes place at the level of the mononucleotide precursors of nucleic acids and not at the

level of these macromolecules.

Back in Brussels, I rushed into the office of my master, Albert Dalcq, to tell him my nice tale. He listened to me placidly and told me that he would believe the presence of plant nucleic acid in sea-urchin eggs only the day I could show it under the microscope. After several not very encouraging attempts, I found, in 1939, a simple cytochemical technique for detecting RNA in cells. To my great joy, I found RNA, like DNA, to be a universal constituent of cells (bacterial, vegetal and animal). The intracellular localization of these two types of nucleic acid is, however, quite different: whereas DNA is found in chromatin and chromosomes, RNA accumulates in cytoplasm and nucleoli. In addition, whereas the amount of DNA per nucleus remains constant in a definite species (allowing for its doubling when cells prepare for division), the amount of RNA varies considerably from one tissue to the other: I saw a completely unexpected correlation between the quantity of RNA in a cell and its capacity to synthesize proteins. This led me to another iconoclastic proposition: proteins are not synthesized by proteolytic enzymes operating 'backwards' (as was generally thought), but by an unknown mechanism implicating RNA. The same conclusion was arrived at simultaneously (1941) by T. Caspersson in Stockholm, who was using a completely different technique for the cytochemical detection of nucleic acids. My ideas (net synthesis of DNA when cells divide; presence of a vegetal nucleic acid – RNA – in all cells; intervention of RNA in protein synthesis) were of course violently criticized; it became necessary to battle firmly and do many experiments to check them and refute all objections.

During the war, my colleague R. Jeener and I tried to demonstrate biochemically the hypothesis of intervention of RNA in protein synthesis. The results of our experiments went the right way, but it was impossible for us to obtain definitive proof because we did not have the necessary tool (radioactive amino acids). Just after 1950, several American laboratories demonstrated that the integrity of RNA was indispensable for radioactive nucleic acids to become incorporated in nascent proteins. Reading these papers made me as happy as if they had been mine. However, no-one understood at the time how an RNA could direct the synthesis of a specific protein. The astounding development of Molecular Biology in the 1960's gave clues to this enigma.

It can be seen that as early as 1942 we already knew the fundamental principles of the 'central dogma' of molecular biology (DNA makes DNA, DNA makes RNA, RNA makes proteins) owing to research on oocytes and eggs. Chemical embryology had become Molecular Embryology; between 1930 and 1940 I was doing molecular biology without knowing it, just like Monsieur Jourdain, who was talking prose without knowing it. But neither the mechanism of DNA repli-

cation nor those of its transcription into RNA and the translation of the latter into proteins was understood.

The explanation of the mystery of translation (how a sequence of nucleotides can direct the rigorously ordered assembly of amino acids) was found by the discovery of messenger RNA and the elucidation of the genetic code.

Luck (once more!) put me by chance onto the track of messenger RNA. As we have seen, I had always dreamt of studying nuclear cytoplasmic interactions in unicellular organisms. The opportunity came in 1950–1955, when I had the possibility of sectioning into two halves (nucleated and non-nucleated) amoebae and giant unicellular algae (*Acetabularia mediterranea*). These experiments showed that RNAs were synthesized in the nucleus and then passed into the cytoplasm; the latter is the exclusive site of protein synthesis and of energy production. But the case of *Acetabularia* was strange: non-nucleated fragments of this alga not only go on living for weeks, if not months, but are even capable of forming a complex structure, the cap or umbrella. As Hämmerling had shown as early as 1934, the structure of this umbrella is determined by nuclear genes; however, the cap is perfectly normal in anucleated fragments necessarily devoid of all these genes. There, again, was an interesting paradox for a curious mind. Biochemical experiments, done in collaboration with our colleague H. Chantrenne, showed us that anucleate fragments of *Acetabularia* are capable of synthesizing proteins (including specific enzymes, RNA and – oh, surprise! – DNA). This was the first demonstration that chloroplasts contain DNA and that they have a sufficient autonomy to multiply in the absence of a nucleus. Complementary experiments clearly showed that chloroplastic DNA plays no rôle in the morphogenesis of anucleate fragments of the alga. To explain this paradox, I saw but one explanation (1959): chromosomal DNA would send copies of genes into the cytoplasm; these ‘informational’ RNA’s, stable and carrying into the cytoplasm the information contained in the genes, would instruct the synthesis of specific proteins. A few

weeks later, Jacob and Monod made the same hypothesis in the case of bacteria and baptised these informational RNAs with the very suggestive name of messenger RNAs (carrying into the cytoplasm messages coming from the nuclear genes).

It is impossible to give a robot portrait of the experimental investigator. Personally, I always accepted being led by my curiosity of the moment, skipping unceasingly from an egg to an amoeba, from an alga to an onion root. Others, more numerous, remain faithful to the experimental material which gave them their first discovery; they continue digging for years on a finding of their youth. Yet others work chiefly because it amuses them: they love playing with sophisticated apparatuses. These distinctions are certainly too clear-cut, and we have a bit of everything. Generally speaking, the investigator has a solid intelligence, but lacks genius. We must have flair to choose a problem easily accessible to experimentation; this problem has to be well defined, and the strategy to solve it must be imagined by the research worker. He needs stubbornness, but also tact in establishing collaboration with others. His greatest quality must be perfect honesty: the scarceness of jobs and difficulties in obtaining research grants are causes of the recent increase in scientific fraud. Now fraud (faking experiments) is detrimental to scientific progress, lethal to the scientific career of the unmasked culprit.

The experimenter progresses step by step; he must unceasingly correct his errors and those of others; his working hypotheses have limited implications. His approach is necessarily ‘reductionist’: he must simplify as much as possible the problems and objects (bacteria, phages) of his research. He accumulates gradually a gigantic amount of facts, only a few of which deserve to be remembered. But it is on these facts, patiently uncovered by experimenters, that theoreticians attempting to explain Life by a general theory must found their thinking.

PROTÉINES DE STRUCTURE DE SZENT-GYÖRGYI ET THYMONUCLÉO-HISTONE

par

J. BRACHET ET R. JEENER

Laboratoires de Morphologie animale et de Physiologie animale. Faculté des Sciences de l'Université libre de Bruxelles (Belgique)

I. INTRODUCTION

On sait que SZENT-GYÖRGYI et ses collaborateurs^{1, 2} ont isolé, à partir de nombreux tissus animaux et végétaux, des protéines fibreuses dont les solutions se caractérisent par une intense biréfringence d'écoulement, une viscosité élevée et une thixotropie marquée. Ces protéines, qui interviendraient dans la structure même du cytoplasme cellulaire, s'obtiennent en broyant les organes dans la solution saline d'Edsall (KCl 0.3M; CO_3Na_2 0.01M; CO_3NaH 0.04M) additionnée de 30% d'urée : celle-ci servirait à rompre les liaisons hydrogène unissant les molécules protéiques les unes aux autres et faciliterait ainsi leur mise en solution. On peut purifier ces protéines de structure en les précipitant par dilution de l'extrait à l'Edsall-urée avec 5 volumes d'eau et neutralisation. En répétant cette purification et en traitant ensuite la protéine par l'acide trichloracétique, l'alcool chaud et le chloroforme, BANGA et SZENT-GYÖRGYI² ont obtenu des substances contenant de 0.53 à 2.28% de P et 11 à 16% de N, suivant les organes dont ils étaient partis. La richesse en P a conduit les auteurs hongrois à penser qu'il s'agit de nucléoprotéides à molécules fibreuses. Leur localisation dans la cellule serait cytoplasmique et non nucléaire : en effet, le noyau reste intact après traitement des cellules à l'Edsall-urée. Peut-être ces protéines de structure régleraient-elles le transport de l'eau dans la cellule (SZENT-GYÖRGYI¹).

La protéine de structure du rein (rénosine) constitue 30% environ des protéines totales ; elle ressemble à divers égards à la myosine du muscle, mais s'en distingue nettement en deux endroits : la présence de P dans la rénosine et le signe de la biréfringence d'écoulement : alors qu'elle est positive pour la myosine, comme dans toutes les protéines fibreuses connues d'ailleurs, elle est négative dans le cas de la rénosine (BANGA et SZENT-GYÖRGYI²).

Dans un travail antérieur³, nous avons montré que les préparations de rénosine contiennent en abondance des granules de nature ribonucléoprotéique à localisation cytoplasmique (microsomes de CLAUDE^{4, 5}) ; sous l'influence de l'Edsall-urée, ces granules subissent d'ailleurs des altérations et perdent leur acide ribonucléique ; celui-ci se retrouve en partie dans la rénosine purifiée. Ces observations paraissent, à première vue, favorable à l'idée de la localisation cytoplasmique des protéines de structure ; mais il importe d'ajouter que les granules ne sont en rien responsables des propriétés caractéristiques des protéines de structure : on peut en effet les éliminer par ultracentrifugation

Bibliographie p. 19.

(BANGA et SZENT-GYÖRGYI², BRACHET et JEENER³) sans modifier la biréfringence d'écoulement de signe négatif, la viscosité et la thixotropie des solutions.

Par la suite, l'un de nous (R. JEENER⁶) a entrepris une étude des propriétés physiques et chimiques de la thymonucléohistone extraite des noyaux des globules rouges d'Oiseaux ; les résultats qu'il a obtenus et qui feront l'objet d'un travail à part se rapprochent fortement de ceux publiés aux États-Unis par CARTER et HALL⁷, HALL⁸, MIRSKY et POLLISTER^{9, 10, 11}, HOERR¹², LAZAROW¹³, CLAUDE⁵ et BENSLEY¹⁴. Les intéressantes publications des travailleurs américains ne nous étaient d'ailleurs pas connues au moment où nous avons effectué les recherches qui font l'objet du présent travail et c'est pourquoi nous n'y avons pas fait allusion dans une note préliminaire¹⁵.

La thymonucléohistone s'obtient en traitant des globules rouges d'oiseaux hémolysés et lavés par des solutions salines (NaCl, KCl) concentrées ; on peut la précipiter sous forme de fibres par dilution. Les extraits des noyaux d'érythrocytes sont fortement filants et ils présentent une viscosité de structure élevée ; en outre, ces solutions de thymonucléohistone montrent une intense biréfringence d'écoulement dans l'appareil de GERENDAS¹⁶, utilisé par BANGA et SZENT-GYÖRGYI² ; cette biréfringence est de signe négatif et elle est due à l'acide thymonucléique sous forme hautement polymérisée (CASPERSSON, SIGNER et HAMMARSTEN¹⁷, ASTBURY et BELL¹⁸, GREENSTEIN et JENRETTE¹⁹, GREENSTEIN²⁰, JEENER⁶.)

On voit que le parallélisme entre les propriétés physiques et chimiques de la thymonucléohistone d'une part, des protéines de structure de l'autre est réellement impressionnant ; dans ces conditions, la localisation cytoplasmique de ces dernières se voyait sérieusement remise en question et c'est afin de savoir s'il y a oui ou non identité entre les deux types de substances que nous avons entrepris les expériences suivantes.

2. RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

a. *Observations cytologiques.* Nous avons tout d'abord essayé de suivre les effets de l'urée-Edsall sur des cellules placées sous le microscope ordinaire ou polarisant. L'épiderme de jeunes larves d'urodèles, formé d'une lame mince de cellules volumineuses, constitue un matériel très favorable pour de telles études.

Lorsqu'on ajoute un peu d'Edsall-urée à un tel lambeau d'épiderme, on n'observe, en 5 à 10 minutes, qu'un gonflement des noyaux ; mais si on écrase la préparation tout en déplaçant latéralement la lamelle, on constate que de nombreux noyaux s'étirent fortement au point de former de longues fibres ; celles-ci présentent une belle biréfringence négative et elles sont électivement colorables par un colorant basique tel que le vert de méthyle. De telles préparations ne présentent pas d'autres éléments fortement biréfringents que ces fibres d'origine nucléaire.

Des observations identiques peuvent être faites sur de petits caillots de sang de grenouille placés sur des lames porte-objets ; en écrasant les cellules et en les étirant, après avoir fait agir l'Edsall-urée pendant quelques minutes, on voit se former des fibres à biréfringence négative ; elles sont seules à se colorer par le bleu de toluidine ou par la réaction de Feulgen. On trouve aisément, sur une même préparation, tous les intermédiaires entre des noyaux intacts, de forme ovale, et de longs fils Feulgen positifs.

On voit donc que les noyaux soumis à l'Edsall-urée et écrasés se transforment en partie en fibres de nucléohistone, au lieu de rester intacts, comme le pensait SZENT-

GYÖRGYI¹ ; en outre, on ne voit pas apparaître de fibres à biréfringence négative dans le cytoplasme.

b. *Action de la thymonucléo-dépolymérase sur la rénosine.* On sait qu'il existe un enzyme capable de dépolymériser l'acide thymonucléique natif en scindant la macromolécule fibreuse en oligonucléotides (thymonucléodépolymérase ou des-ribonucléase). Lorsqu'on fait agir ce ferment sur de l'acide thymonucléique ou de la thymonucléohistone, on assiste à une disparition rapide de la biréfringence d'écoulement et à une chute de la viscosité de structure (GREENSTEIN et JENRETTE¹⁹, GREENSTEIN²⁰, JEENER⁶)

Il nous a paru dès lors opportun d'examiner les effets éventuels de cette dépolymérase sur une protéine de structure, telle que la rénosine. Celle-ci fut préparée en extrayant les reins d'un lapin avec 10 volumes d'Edsall-urée pendant un quart d'heure. Après centrifugation pendant 20 minutes à 3.000 tours, on obtint un liquide surnageant très filant, visqueux et pourvu d'une forte biréfringence d'écoulement dans l'appareil de GERENDAS¹⁶. Cette biréfringence s'accroissait encore par addition à l'extrait de taurocholate de Na à raison de 2%. En plaçant l'appareil de GERENDAS sur la platine d'un microscope polarisant, il fut aisé de reconnaître que la biréfringence d'écoulement était bien de signe négatif.

La thymonucléo-dépolymérase fut préparée à partir de pancréas frais par la méthode de FISCHER et al²¹ ; elle fut ajoutée à la solution de rénosine à raison de 10 mg/cc environ et activée par l'addition d'un cristal de MgCl₂. En quelques instants, la viscosité et le caractère filant de la solution de rénosine disparurent ; quant à la biréfringence d'écoulement, elle fut entièrement abolie, même après éclaircissement de l'extrait au moyen de taurocholate.

On voit donc que l'addition de thymonucléo-dépolymérase fait disparaître rapidement et complètement les propriétés physiques caractéristiques de la rénosine ; cette constatation vient naturellement renforcer l'idée que l'élément actif dans les protéines de structure est l'acide thymonucléique hautement polymérisé.

c. *Recherche de l'acide thymonucléique dans la rénosine.* L'action de la thymonucléo-dépolymérase ne s'explique que si la rénosine contient réellement de l'acide thymonucléique. Afin de tirer la chose au clair, une partie de la rénosine préparée pour l'expérience précédente fut purifiée par précipitation en diluant et redissolution répétées. Le précipité fut finalement lavé de façon prolongée à l'alcool et à l'éther, puis séché. La poudre ainsi obtenue fut analysée au point de vue de sa teneur en P (méthode de BERENBLUM et CHAIN²²) et en acide thymonucléique (technique de DISCHE²³ légèrement modifiée).

La teneur en P du précipité était de 0,47%, chiffre voisin des valeurs les plus basses trouvées par BANGA et SZENT-GYÖRGYI² pour différentes protéines de structure. La réaction de DISCHE était fortement positive et son intensité correspondait à une teneur en acide thymonucléique de 2,2% pour la poudre sèche. On voit que près de la moitié du phosphore présent dans la préparation s'y trouvait sous forme d'acide thymonucléique. Il est à noter qu'au cours des précipitations successives, nous avons observé une diminution progressive de la viscosité et du caractère filant de la solution ; il se pourrait donc qu'il se produise des pertes ou une dépolymérisation de cet acide au cours de la purification.

Quoiqu'il en soit, la présence d'acide thymonucléique en quantités appréciables dans la rénosine suffit à démontrer que cette protéine de structure est en partie d'origine nucléaire : il est en effet bien établi que l'acide thymonucléique se rencontre exclusivement dans la chromatine.

d. *Protéines de structure des globules rouges, des levures et des œufs.* Si les propriétés physiques caractéristiques des protéines de structure sont dues à leur teneur en thymonucléohistone, il faut s'attendre à ce qu'elles fassent défaut dans les cellules anucléées ou très pauvres en chromatine.

Effectivement, en traitant des globules rouges de lapin, lavés dans du NaCl isotonique à plusieurs reprises, par de l'Edsall-urée, on n'obtient pas de solution filante et visqueuse ; il en va de même lorsqu'on cherche à extraire les protéines des stromas de ces globules rouges, préalablement hémolysés par congélation et décongélation brusques par de l'Edsall-urée. Dans ce dernier cas, nous nous sommes assurés que l'extrait est également dépourvu de biréfringence d'écoulement.

Au contraire, les hématies nucléées de l'oie se comportent de façon toute différente : après lavage, hémolyse et traitement par l'Edsall-urée, on obtient un extrait fortement visqueux et filant, présentant une intense biréfringence d'écoulement. Cet extrait se comporte en tous points comme la thymonucléohistone isolée des mêmes cellules.

Le contraste entre les hématies nucléées et anucléées est donc extraordinairement frappant. Des résultats comparables aux nôtres ont d'ailleurs été obtenus par LAZAROW¹³ : traitant des globules rouges nucléés et anucléés par du NaCl 10%, il a constaté que seuls les premiers fournissent un extrait riche en protéines fibreuses.

Les levures, dont le noyau est extrêmement petit, se comportent tout à fait comme les globules rouges des Mammifères : après broyage des cellules avec un volume égal de sable et extraction avec 5 à 10 volumes d'Edsall-urée, on obtient un liquide très trouble, fourmillant de microsomes, mais dépourvu de biréfringence d'écoulement (même après éclaircissement par le taurocholate) et de tout caractère filant.

Enfin, les résultats obtenus précédemment par BRACHET et CHANTRENNE²⁴ sur les œufs de grenouille en voie de développement sont aussi en parfait accord avec ces données : les œufs vierges ou fraîchement fécondés, qui n'ont qu'un petit noyau, donnent des extraits troubles, mais dépourvus de caractère filant et de biréfringence d'écoulement ; les jeunes têtards, au contraire, contiennent une protéine de structure typique. Or le développement embryonnaire s'accompagne précisément d'une multiplication intense des noyaux et d'une synthèse marquée d'acide thymonucléique ; la réalité de cette synthèse a du reste été démontrée chez la grenouille par l'un de nous²⁴. La néoformation de protéines de structure au cours du développement ne doit donc pas être attribuée, comme BRACHET et CHANTRENNE²⁵ l'avaient d'abord pensé, à une synthèse de cytoplasme aux dépens de deutoplasme : elle est en réalité la conséquence de la multiplication nucléaire. Ce même point de vue ressort aussi des observations de MIRSKY et POLLISTER^{10, 11} : l'œuf de carpe, qui n'a qu'un très petit noyau, ne contient presque pas de protéines fibreuses solubles dans NaCl concentré, alors que les spermatozoïdes en renferment en abondance.

Notons enfin, dans le même ordre d'idées, que les tissus dont les protéines de structure présentent la plus forte biréfringence d'écoulement sont, d'après BANGA et SZENT-GYÖRGYI², les embryons de souris, les ganglions lymphatiques et les sarcomes du rat : or ce sont précisément des organes particulièrement riches en noyaux.

e. *Comparaison entre les propriétés des protéines de structure et celles de la thymonucléohistone.*

Nous avons déjà vu qu'il existe un parallélisme étroit entre ces deux substances à de nombreux égards : viscosité, biréfringence d'écoulement de signe négatif, présence

d'acide thymonucléique, comportement vis-à-vis de la thymonucléo-dépolymérase.

Mais l'analogie peut être poussée encore plus loin : c'est ainsi que l'un de nous ⁶ a montré que la thymonucléohistone forme des fils lorsqu'on l'étire dans l'eau distillée ; ces fils se rétractent fortement en présence de petites quantités d'ions Ca^{++} . Ces particularités se retrouvent intégralement lorsqu'on substitue la rénosine à la thymonucléohistone.

Le comportement de la rénosine vis-à-vis des acides, des alcalis de l'alcool et des sels biliaires a été étudié par BANGA et SZENT-GYÖRGYI ² ; nous avons retrouvé des réactions quasi-identiques pour la thymonucléohistone des hématies nucléées d'Oiseaux. C'est ainsi que, dans les deux cas, on obtient un précipité partiellement soluble à chaud, par HCl N ; le liquide obtenu après neutralisation a perdu sa biréfringence.

Le carbonate de Na 0.5M et le taurocholate de Na 2% intensifient au contraire la biréfringence, dans le cas de la thymonucléohistone comme dans celui de la rénosine. L'alcool à 30% diminue fortement la biréfringence d'écoulement de la thymonucléohistone et abolit celle, d'ailleurs moins marquée, de la rénosine. La seule différence réelle que nous ayons pu observer entre ces deux substances concerne l'effet de la soude caustique : alors que la rénosine reste biréfringente dans NaOH 2 à 5%, la thymonucléohistone cesse déjà de l'être dans NaOH 0,3 à 0,4%. La raison d'être de cette divergence n'a pu être encore élucidée, mais il faut remarquer que la thymonucléohistone constituait un produit beaucoup plus pur que la rénosine.

3. DISCUSSION DES RÉSULTATS

Il résulte clairement de nos observations que les protéines de structure correspondent en réalité à un mélange complexe de constituants d'origine cytoplasmique (notamment microsomes ribonucléoprotéiques, en partie altérés du reste) et nucléaire (thymonucléohistone). La présence de composants nucléaires est bien établie par les dosages d'acide thymonucléique et les observations cytologiques sur la transformation des noyaux en fibres nucléo-protéiques dans l'Edsall-urée. La disparition rapide des propriétés physiques caractéristiques des protéines de structure lorsqu'on les traite par un enzyme dépolymérisant l'acide thymonucléique et le fait que les cellules pauvres en chromatine ne donnent pas d'extraits visqueux et biréfringents à l'écoulement démontrent que c'est à l'acide thymonucléique hautement polymérisé qu'il convient d'attribuer le rôle prépondérant. Pareille conclusion cadre d'ailleurs bien avec la disparition spontanée à la longue de la biréfringence d'écoulement de la rénosine (BANGA et SZENT-GYÖRGYI ²) : la thymonucléo-dépolymérase est en effet un ferment très répandu, présent dans le sérum et la plupart des organes (GREENSTEIN et JENRETTE ¹⁹). On comprend aussi que BANGA et SZENT-GYÖRGYI ² n'aient pu obtenir de protéine de structure à partir du pancréas : cet organe est en effet extraordinairement riche en thymonucléo-dépolymérase et on conçoit que l'acide thymonucléique présent dans l'extrait à l'Edsall-urée du pancréas soit très rapidement dépolymérisé.

Il existe visiblement une analogie marquée entre les protéines de structure de SZENT-GYÖRGYI et la „plasmosine" de BENSLEY ²⁶ : cet auteur a obtenu, en extrayant des tranches de foie congelé et desséché par du NaCl 10%, des solutions visqueuses et fortement biréfringentes ; tout comme la rénosine et la thymonucléohistone, la plasmosine forme des précipités fibreux dans l'eau distillée. BENSLEY a constaté que les solutions salines qu'il utilisait dissolvent plus rapidement le cytoplasme que les noyaux

et c'est pourquoi il croit à la localisation cytoplasmique de la plasmosine. Mais cet avis n'est pas partagé par MIRSKY et POLLISTER ^{9, 10, 11} qui ont pu extraire aisément par NaCl concentré la chromatine ; comme ils constatent que la plasmosine contient de l'acide thymonucléique et que le rendement en plasmosine est d'autant plus élevé qu'on s'adresse à un organe plus riche en noyaux, MIRSKY et POLLISTER ^{9, 10, 11} aboutissent à la conclusion que la plasmosine n'est autre chose que de la thymonucléohistone.

Les conclusions de MIRSKY et POLLISTER ^{9, 10, 11} ne sont toutefois pas acceptées sans discussion par l'école de BENSLEY : si LAZAROW ¹³ admet que la plasmosine est un thymonucléoprotéide qu'on ne peut obtenir qu'aux dépens de cellules nucléées, HOERR ¹² maintient qu'il s'agit d'une substance cytoplasmique : HOERR a en effet obtenu de très petites quantités de plasmosine à partir de débris cellulaires de foie légèrement malaxé, débris apparemment dépourvus de constituants nucléaires. HOERR ¹³ reconnaît toutefois que le contenu des noyaux est partiellement soluble dans NaCl 10%.

Il serait intéressant de rechercher si la plasmosine isolée par HOERR est réellement dépourvue d'acide thymonucléique et si elle conserve ses propriétés physiques après un traitement par une préparation très active de thymonucléo-dépolymérase. Tant que de tels contrôles n'auront pas été effectués, les probabilités resteront que la plasmosine, comme les protéines de structure, est un mélange de constituants nucléaires et cytoplasmiques qui doit ses propriétés physiques spéciales à la présence de thymonucléohistone.

Terminons par quelques remarques au sujet des relations possibles entre les protéines de structure, la thymonucléohistone et les protéines allongées isolées par LAWRENCE, J. NEEDHAM et SHEN ²⁷ à partir de neurulas d'Amphibiens. Les auteurs anglais ont trouvé à ce stade des protéines, appartenant aux fractions „globulines" et „myosine", dont les molécules ont une forme allongée et qui pourraient jouer un rôle dans la formation de la gouttière neurale : l'étirement de certaines cellules ectodermiques à ce moment pourrait être dû à une augmentation du nombre ou à un allongement de ces molécules protéiques. On peut se demander si certaines des protéines fibreuses étudiées par LAWRENCE *et al* ²⁷, en particulier celles de la fraction „myosine", ne sont pas aussi contaminées par de la thymonucléohistone. Nous avons constaté en effet que les solutions salines utilisées couramment pour extraire la myosine du muscle dissolvent le vitellus des œufs à tous les stades ; elles dissolvent, en outre, de la thymonucléohistone au moment où les noyaux commencent à devenir nombreux (gastrulas, neurulas) ; les extraits, à ce moment, contiennent de l'acide thymonucléique et deviennent beaucoup plus visqueux. Il se pourrait donc qu'une partie importante des protéines auxquelles LAWRENCE *et al* ²⁷ attribuent un rôle morphogénétique soient en réalité d'origine nucléaire, alors que c'est au revêtement superficiel des cellules que paraît bien être dévolue la fonction d'assurer les mouvements de gastrulation et de neurulation (HOLTFRETER ^{28, 29, 30}).

RÉSUMÉ

1. Les propriétés physiques et chimiques des protéines de structure de SZENT-GYÖRGYI et celles de la thymonucléohistone sont extrêmement semblables ; la rénosine contient plus de 2% d'acide thymonucléique.

2. Lorsque des cellules sont traitées par l'Edsall-urée et écrasées, les noyaux peuvent former des fibres biréfringentes de thymonucléohistone.

3. La viscosité et la biréfringence d'écoulement des protéines de structure disparaissent rapidement lorsqu'on les traite par la thymonucléodépolymérase.

Bibliographie p. 19.

4. Les cellules anucléées ou pourvues d'un très petit noyau ne contiennent pas de protéines de structure en quantités appréciables.

5. Il faut en conclure que les protéines de structure sont des mélanges de constituants nucléaires et cytoplasmiques, qui doivent leurs propriétés physiques spécifiques à un composé nucléaire, la thymonucléohistone.

6. Les rapports entre les protéines de structure, la thymonucléohistone, la plasmosine de Bensley et les protéines allongées de la neurula d'Amphibiens (LAWRENCE, NEEDHAM et SHEN) sont brièvement discutés.

SUMMARY

1. The physical and chemical properties of both SZENT-GYÖRGYI's structure proteins and thymonucleohistone are very much alike ; renosine contains more than 2% thymonucleic acid.

2. When cells are treated with Edsall-urea solution and crushed, the nuclei may elongate into birefringent fibers of thymonucleohistone.

3. The viscosity and flow birefringence of renosine show a swift and sharp decrease when thymonucleo-depolymerase is added to the protein.

4. Anucleated cells or cells provided with a very small nucleus fail to give any appreciable amount of structure proteins.

5. The conclusion is drawn that structure proteins are a mixture of cytoplasmic and nuclear components, their specific physical properties being due to a nuclear constituent, thymonucleohistone.

6. The relationship between structure proteins, thymonucleohistone, Bensley's plasmosine and the anisometric proteins of the Amphibian neurula (LAWRENCE, NEEDHAM and SHEN) is briefly discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der SZENT-GYÖRGYI'scher Strukturproteine und die des Thymonucleohistons zeigen eine ausserordentlich grosse Aehnlichkeit ; Renosin enthält mehr als 2% Thymonucleinsäure.

2. Wenn Zellen mit Edsall-Harnstofflösung behandelt und dann zermahlt werden, so können die Kerne doppelbrechende Thymonucleohistonfasern bilden.

3. Die Viskosität und die Doppelbrechung der Struktur-Proteine verschwinden schnell, wenn man sie mit Thymonucleodepolymerase behandelt.

4. Die kernlosen Zellen bzw. die Zellen mit einem sehr kleinen Kern enthalten keine bedeutenden Mengen von Struktur-Proteinen.

5. Hieraus folgt, dass Struktur-Proteine Mischungen von Kern- und Cytoplasmabestandteilen sind, welche ihre spezifischen physikalischen Eigenschaften einem Kernbestandteil, dem Thymonucleohiston, verdanken.

6. Die Beziehungen zwischen den Struktur-Proteinen, Thymonucleohiston, dem Plasmosin von Bensley und den anisometrischen Proteinen der Amphibien-Neurula (LAWRENCE, NEEDHAM und SHEN) werden kurz erörtert.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. SZENT-GYÖRGYI, *Enzymol.*, **9** (1942) 98.
- ² I. BANGA et A. SZENT-GYÖRGYI, *Enzymol.*, **9** (1940) 111.
- ³ J. BRACHET et R. JEENER, *Enzymol.*, **13** (1944) 196.
- ⁴ A. CLAUDE, *Science*, **91** (1940) 77.
- ⁵ A. CLAUDE, *Biol. Symp.*, **10** (1943) 111.
- ⁶ R. JEENER, *C. R. Soc. Biol.*, **138** (1944) 1050.
- ⁷ R. O. CARTER et J. L. HALL, *J. Amer. Chem. Soc.*, **63** (1941) 794.
- ⁸ J. L. HALL, *J. Amer. Chem. Soc.*, **63** (1941) 1960.
- ⁹ A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **28** (1942) 344.
- ¹⁰ A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, **5** (1943) 190.
- ¹¹ A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, *Biol. Symp.*, **10** (1943) 247.
- ¹² N. L. HOERR, *Biol. Symp.*, **10** (1943) 185.

Bibliographie p. 19.

- ¹³ A. LAZAROW, *Biol. Symp.*, **10** (1943) 9.
- ¹⁴ R. R. BENSLEY, *Biol. Symp.*, **10** (1943) 323.
- ¹⁵ J. BRACHET et R. JEENER, *C.R. Soc. Biol.*, sous presse.
- ¹⁶ M. GERENDAS, *Enzymol.*, **9** (1940) 123.
- ¹⁷ R. SIGNER, T. CASPERSSON et E. HAMMARSTEN, *Nature*, **141** (1938) 122.
- ¹⁸ W. T. ASTBURY et F. O. BELL, *Cold Spring Harbor Symp.*, **6** (1938) 109.
- ¹⁹ J. P. GREENSTEIN et W. W. JENRETTE, *Cold Spring Harbor Symp.*, **9** (1941) 236.
- ²⁰ J. P. GREENSTEIN, *Adv. Protein Chem.*, **1** (1944) 210.
- ²¹ F. G. FISCHER, I. BÖTTGER et H. LEHMANN-ECHTERNACHT, *Z. Physiol. Chem.*, **271** (1941) 246.
- ²² I. BERENBLUM et E. CHAIN, *Bioch. J.*, **32** (1938) 286.
- ²³ Z. DISCHE, *Mikrochemie*, **8** (1930) 4.
- ²⁴ J. BRACHET, *Arch. Biol.*, **48** (1937) 529.
- ²⁵ J. BRACHET et H. CHANTRENNE, *Acta Biol. belg.*, **2** (1942) 451.
- ²⁶ R. R. BENSLEY, *Anat. Rec.*, **72** (1938) 351.
- ²⁷ A. LAWRENCE, J. NEEDHAM et S. C. SHEN, *Nature*, **2** (1940) 104.
- ²⁸ J. HOLTFRETER, *J. exper. Zool.*, **93** (1943) 251.
- ²⁹ J. HOLTFRETER, *J. exper. Zool.*, **94** (1943) 261.
- ³⁰ J. HOLTFRETER, *J. exper. Zool.*, **95** (1944) 171.

Reçu le 26 mars 1946.