

**Summary**

This preliminary communication describes red, watersoluble pigments elaborated by an adenine-deficient mutant of a haploid strain of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Acid hydrolysis of these pigments liberates a number of amino acids. Some of the physical and chemical properties of these yeast pigments resemble those of the antipernicious anæmia factor (vitamin  $B_{12}^1$ ) which contains one atom of cobalt and three atoms of phosphorus, with a molecular weight of 1,500. Our yeast pigments contain no cobalt but one or two atoms of phosphorus, with an approximate molecular weight of 2,000.

A report on the biological activities of our pigments will appear in the near future.

<sup>1</sup> Cf. notes 3 and 4 p. 433, 2<sup>nd</sup> column.

## La teneur du noyau cellulaire en acide désoxyribonucléique à travers les organes, les individus et les espèces animales

### Techniques et premiers résultats

Le contenu en acide désoxyribonucléique des tissus animaux a déjà fait l'objet de nombreuses recherches<sup>1</sup>. Les auteurs ont exprimé leurs résultats en pourcentage du poids frais ou sec des noyaux et cela leur a permis de relever une corrélation, au moins grossière, entre la teneur des tissus en acide désoxyribonucléique et leur richesse en noyaux, telle que la révèlent les images histologiques. Il nous a semblé qu'il serait d'un réel intérêt de préciser la quantité d'acide désoxyribonucléique *par noyau* et de voir quelles variations cette quantité est susceptible de subir de noyau à noyau chez un même individu, d'individu à individu dans une même espèce et d'espèce animale à espèce animale. Quelques premiers coups de sonde dans cette direction, effectués en collaboration avec notre maître, le Prof. A. BOIVIN, nous ont laissé entrevoir une remarquable constance dans la teneur en acide désoxyribonucléique du noyau de toutes les cellules et chez tous les individus dans une même espèce animale<sup>2</sup>. Nous voudrions apporter ici de nouvelles données d'expérience à l'appui de cette thèse et décrire sommairement les techniques que nous avons mises en œuvre.

### Techniques utilisées

**1<sup>o</sup> Isolement des noyaux.** Divers auteurs se sont déjà préoccupés d'isoler les noyaux des tissus animaux<sup>3</sup>. Nous avons étudié les techniques qu'ils ont employées et, après maints tâtonnements, nous avons réglé la façon de faire suivante, qui s'inspire plus spécialement de la méthode de STONEBURG.

Les organes congelés à l'abattoir même sont amenés au laboratoire à l'état congelé, puis gardés à  $-25^{\circ}$  jusqu'au moment de les utiliser. Au rasoir, on les débite alors rapidement en tranches aussi minces que possible, qu'on met en suspension dans environ 10 fois leur poids d'acide citrique  $\frac{M}{3}$ , refroidi à zéro degré. On agite mécaniquement durant 15 minutes, on

filtre sur papier à très larges pores, puis on centrifuge à 3500 tours pendant 10 minutes, dans un appareil refroidi par un courant d'eau. La liqueur surnageante, qui renferme des débris cytoplasmiques est écartée. Le culot contenant les noyaux, est repris par de l'acide citrique  $\frac{M}{18}$ , puis centrifugé dans les mêmes conditions. On répète encore, une ou plusieurs fois la même opération, en suivant la purification par des examens microscopiques (sans coloration et en diaphragmant fortement pour mieux voir les fins débris cytoplasmiques éventuellement présents). Lorsqu'on a obtenu une disparition presque totale des granulations d'origine cytoplasmique, on effectue une dernière centrifugation dans de l'acide citrique  $\frac{M}{18}$ , mais en tournant cette fois à 2500 tours seulement, pendant 6 à 7 minutes; cette ultime précaution est destinée àachever l'élimination des matières étrangères, ce dont on s'assure au microscope. Le culot de centrifugation final est mis en suspension dans de l'acide citrique  $\frac{M}{18}$ .

A partir d'organes comme le foie, le thymus, le rein, le pancréas, il est facile d'obtenir ainsi au total des grammes de noyaux (poids frais), pour les soumettre à l'analyse chimique. D'autres organes comme le muscle et les centres nerveux se prêtent beaucoup moins bien à l'isolement de leurs noyaux et ne conduisent qu'à de très mauvais rendements.

L'acide citrique a le double avantage de solubiliser largement les ribonucléoprotéines cytoplasmiques et d'inhiber l'action des désoxyribonucléases éventuellement présentes.

**2<sup>o</sup> Numération des noyaux.** Elle s'opère sur la suspension citrique convenablement diluée, en ayant recours à une cellule servant à compter les globules sanguins. Un seul détail mérite d'être signalé. Avant de déposer la goutte de suspension dans la cellule du compte-globules, il convient d'essuyer extérieurement et avec soin la pipette, de laisser perdre quelques gouttes et d'essuyer à nouveau la pipette; cela a pour but de se débarrasser du film de matières lipidiques qui adhère parfois à l'extérieur de la pipette et vient ensuite, par effet de surface, empêcher une répartition uniforme des noyaux dans la mince lame liquide prise entre le fond de la cellule et la lame couvre-objet.

**3<sup>o</sup> Analyse des noyaux.** Nous opérons sur la suspension citrique et utilisons, avec quelques modifications, la méthode donnée par SCHNEIDER<sup>1</sup> pour l'évaluation de l'acide désoxyribonucléique et de l'acide ribonucléique sur les tissus animaux. Nous allons nous contenter de résumer ici la technique à laquelle nous nous sommes arrêtés.

Un traitement préalable à l'acide trichloracétique froid à 5%, pendant une nuit, permet d'éliminer l'acido-soluble, après quoi on récupère les noyaux par centrifugation. Ceux-ci sont alors soumis à l'action de l'acide trichloracétique à 5% pendant 15 minutes à 90 degrés. Ce traitement solubilise les deux acides nucléiques au prix, du reste, d'une hydrolyse partielle de ces corps, dont en particulier se détachent les purines. Sur l'extrait trichloracétique chaud ainsi obtenu, on dose l'acide nucléique total par les purines, après une hydrolyse de 2 heures à  $100^{\circ}$  en milieu  $CIH\ N.$ ; les purines sont évaluées par notre microtechnique de précipitation cuivreuse<sup>2</sup>. Cette évaluation des acides nucléiques par les purines est beaucoup plus spécifique que l'évaluation qu'en a fait SCHNEIDER par le phosphore; d'autre part, elle évite la complication d'une délipidation des noyaux, dont ne peut se passer SCHNEIDER (élimination des phospholipides). Sur le même extrait trichloracétique chaud, on dose en outre l'acide désoxyribonucléique par la technique colorimétrique de DISCHE<sup>3</sup> à la diphenylamine et l'acide ribonucléique par la technique colorimétrique de VON EULER<sup>4</sup> à la phloroglucine.

Dans un certain nombre de cas, nous avons recoupé les résultats ainsi obtenus en mettant en œuvre, avec quelques modifications, la méthode donnée par SCHMIDT et THANNHAUSER<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> W. C. SCHNEIDER, J. Biol. Chem. 161, 293 (1945).

<sup>2</sup> R. VENDRELY et R. SARGIRON, Bull. Soc. Chim. biol. 26, 214 (1944).

<sup>3</sup> Z. DISCHE, Mikrochemie 8, 4 (1930).

<sup>4</sup> H. v. EULER et L. HAHN, Svensk. kem. Tidskr. 58, 251 (1946).

<sup>5</sup> G. SCHMIDT et S. J. THANNHAUSER, J. Biol. Chem. 161, 83 (1945).

<sup>1</sup> Voir spécialement l'article récent de J. N. DAVIDSON (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 12, 50 [1947]) qui résume les résultats de ses devanciers et donne la bibliographie de la question.

<sup>2</sup> Voir notre note préliminaire: A. BOIVIN, R. VENDRELY et C. VENDRELY C. R. Acad. Sci. 226, 1061 (1948).

<sup>3</sup> G. CROSSMON, Science 85, 250 (1937). - C. A. STONEBURG, J. Biol. Chem. 129, 189 (1939). - A. MARSHAK, J. Gen. Physiol. 25, 275 (1941). - M. LASKOWSKI, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49, 354 (1942). - A. LAZAROW, J. Biol. Chem. 140, 75 (1941). - A. DOUNCE, J. Biol. Chem. 147, 685 (1943) et 151, 235 (1943).

Tableau I

Teneurs en acides nucléiques (exprimées en  $\gamma$ ) des noyaux de divers organes chez diverses espèces animales (méthode de SCHNEIDER modifiée)

Nature des acides nucléiques	Bœuf				Porc		Cobaye
	Foie	Thymus	Rein	Pancréas	Foie	Rein	Foie
Acide désoxyribonucléique.	$6,4 \cdot 10^{-6}$	$6,4 \cdot 10^{-6}$	$5,9 \cdot 10^{-6}$	$6,9 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-6}$	$5,2 \cdot 10^{-6}$	$5,9 \cdot 10^{-6}$
Acide ribonucléique. . . . .	$0,3 \cdot 10^{-6}$	$0,5 \cdot 10^{-6}$	$0,5 \cdot 10^{-6}$	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$0,7 \cdot 10^{-6}$	$0,9 \cdot 10^{-6}$
Acide nucléique total:							
calculé . . . . .	$6,7 \cdot 10^{-6}$	$6,9 \cdot 10^{-6}$	$6,4 \cdot 10^{-6}$	$8,3 \cdot 10^{-6}$	$6,5 \cdot 10^{-6}$	$5,9 \cdot 10^{-6}$	$6,8 \cdot 10^{-6}$
dosé directement . . . . .	$6,9 \cdot 10^{-6}$	$7,2 \cdot 10^{-6}$	$6,7 \cdot 10^{-6}$	$7,8 \cdot 10^{-6}$	$6,5 \cdot 10^{-6}$	$5,6 \cdot 10^{-6}$	$6,6 \cdot 10^{-6}$

Tableau II

Comparaison des résultats (exprimés en  $\gamma$ ) donnés par les deux techniques de dosage des acides désoxyribonucléique et ribonucléique appliquées à divers noyaux: technique de SCHNEIDER (Sch) à l'acide trichloracétique chaud et technique de SCHMIDT et THANNHAUSER (S et T) à la soude.

Nature des acides nucléiques	Foie de veau		Thymus de veau		Foie de porc	
	Sch	S et T	Sch	S et T	Sch	S et T
Acide désoxyribonucléique.	$6,4 \cdot 10^{-6}$	$6,1 \cdot 10^{-6}$	$6,4 \cdot 10^{-6}$	$6,8 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-6}$	$4,7 \cdot 10^{-6}$
Acide ribonucléique. . . . .	$0,3 \cdot 10^{-6}$	$0,3 \cdot 10^{-6}$	$0,5 \cdot 10^{-6}$	$0,5 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$

pour leurs travaux. Les noyaux, privés au préalable de leur acido-soluble par l'acide trichloracétique froid, sont traités pendant 18 heures par la soude N. à 37°. Ils se dissolvent complètement en quelques minutes. Sous l'effet de l'alcali, l'acide ribonucléique se résout en mononucléotides acido-solubles, alors que l'acide désoxyribonucléique demeure à l'état macromoléculaire et acido-insoluble. L'addition de 0,2 vol. d'HCl 6 N. et de 1 vol. d'acide trichloracétique à 5% à la solution alcaline des noyaux précipite l'acide désoxyribonucléique (en mélange avec des matières protéiques) et laisse en solution les mononucléotides provenant de la décomposition de l'acide ribonucléique. SCHMIDT et THANNHAUSER évaluent les deux acides nucléiques par des dosages de phosphore. Nous avons préféré, ici encore, substituer des dosages de purines (après hydrolyse acide) beaucoup plus spécifiques et évitant la complication d'une délipidation préalable du matériel. Notons que cette méthode est moins générale que celle de SCHNEIDER, car certaines cellules refusent de se laisser solubiliser totalement par l'alcali (les spermatozoïdes par exemple et aussi les levures et les bactéries). Dans les cas où nous avons pu l'employer avec succès, la méthode à la soude nous a donné les mêmes résultats que la méthode à l'acide trichloracétique chaud.

4° *Calcul des résultats.* Une simple division de la teneur en acide nucléique d'un volume donné de suspension par le nombre de noyaux contenus dans le même volume, permet de connaître la composition d'un seul noyau.

### Résultats

Nous avons opéré jusqu'à présent avec du foie, du thymus, du rein et du pancréas de bœuf (veau, bœuf taureau), avec du foie et du rein de porc, avec du foie de cobaye. Dans le cas du foie et du thymus, on se trouve pratiquement en présence d'un seul type de noyaux (noyaux des grandes cellules polyédriques du foie, noyaux des lymphocytes du thymus); le rein et le pancréas conduisent au contraire à un mélange de plusieurs types de noyaux.

Nous nous sommes aperçus tout d'abord que d'un individu à l'autre dans une même espèce, un même organe (foie de veau, thymus de veau) fournit toujours les mêmes résultats quant à la teneur de ses noyaux en acide désoxyribonucléique, dans les limites de la précision de nos dosages:  $\pm 5\%$ . Cette notion acquise, nous sommes passés à la comparaison des divers organes. Nos résultats sont résumés dans le tableau I.

L'excellent accord entre l'acide nucléique total, cal-

culé par la somme de l'acide désoxyribonucléique dosé selon DISCHE et de l'acide ribonucléique dosé selon VON EULER, et l'acide nucléique total, dosé directement par les purines sur l'extract trichloracétique chaud, est une preuve de la valeur des techniques mises en œuvre. L'écart ne dépasse pas au maximum 7%, ce qui nous laisse largement dans la marge d'erreur de  $\pm 5\%$  par rapport à la moyenne que nous annoncions plus haut. On voit que, malgré leur taille très différente et leur chromatophilie elle aussi très différente, les noyaux du foie, du thymus, du rein et du pancréas de bœuf présentent fort sensiblement la même teneur en acide désoxyribonucléique, soit en moyenne  $6,5 \cdot 10^{-6} \gamma$ , alors que ceux du foie et du rein de porc en renferment à peine  $5,2 \cdot 10^{-6} \gamma$  et ceux du foie de cobaye  $5,9 \cdot 10^{-6} \gamma$ . Les noyaux obtenus par notre technique s'avèrent pauvres en acide ribonucléique. Peut-être l'acide citrique, qui solubilise largement les ribonucléoprotéides cytoplasmiques, élimine-t-il une partie de l'acide ribonucléique nucléaire. Mais nous nous sommes assurés que les désoxyribonucléoprotéides nucléaires isolés des noyaux par la méthode au chlorure de sodium selon MIRSKY et POLLISTER<sup>1</sup> sont insolubles dans l'acide citrique.

Dans le tableau II, nous donnons une comparaison des résultats fournis parallèlement par le SCHNEIDER modifié et par le SCHMIDT et THANNHAUSER modifié.

Nous avons étudié, en outre, la teneur en acide désoxyribonucléique et en acide ribonucléique des spermatozoïdes de taureau. Nous nous sommes adressés, ici, à des cellules entières sans chercher à en isoler les noyaux.

Notre technique de préparation des spermatozoïdes est la suivante: On recueille à l'abattoir des épiddymes de taureaux, on les coupe en menus fragments qu'on place dans de petits paniers en toile métallique suspendus dans des tubes à centrifuger. On centrifuge pendant 5 minutes à 2000 tours dans une machine refroidie. On procède ensuite à une série de lavages des spermatozoïdes à l'eau distillée<sup>2</sup>, par centrifugations différentielles,

<sup>1</sup> A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, Biol. Symp. 10, 247 (1943). – A. E. MIRSKY, Adv. Enzymol. 3, 1 (1943). – A. W. POLLISTER et A. E. MIRSKY, J. Gen. Physiol. 30, 101 (1946). – A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, J. Gen. Physiol. 30, 117 (1946).

<sup>2</sup> CH. A. ZITTEL et B. ZITIN, J. Biol. Chem. 144, 99 (1942).

Tableau III

Teneurs comparées en acide désoxyribonucléique des cellules diploïdes et des cellules haploïdes chez l'espèce bœuf (en  $\gamma$ )

	Cellules diploïdes				Cellules haploïdes
	Foie	Thymus	Rein	Pancréas	Spermatozoïdes
Acide désoxyribonucléique. . . .	$6,4 \cdot 10^{-6}$	$6,4 \cdot 10^{-6}$	$5,9 \cdot 10^{-6}$	$6,9 \cdot 10^{-6}$	$3,3 \cdot 10^{-6}$

jusqu'à ce qu'on obtienne des suspensions de spermatozoïdes parfaitement propres. Il n'y a plus alors qu'à effectuer les numérations et dosages chimiques habituels. Comme nous l'avons déjà dit, la méthode de SCHMIDT et THANINHAUSER s'est avérée imparfaite et nous n'avons pu obtenir une solubilisation totale des spermatozoïdes par la soude. Malgré cela, elle nous a conduit à des résultats en accord d'ordre de grandeur avec ceux obtenus par la méthode de SCHNEIDER. Nous groupons dans le tableau III les chiffres fournis par les spermatozoïdes et ceux donnés par les autres noyaux chez le bœuf.

On voit que les noyaux des spermatozoïdes renferment très sensiblement la moitié de la quantité d'acide désoxyribonucléique contenue dans les noyaux des cellules diploïdes. Ajoutons que les spermatozoïdes (totaux) sont très pauvres en acide ribonucléique ( $0,2 \cdot 10^{-6} \gamma$  par spermatozoïde).

#### Discussion

Nous avons exposé antérieurement<sup>1</sup> comment l'analyse du phénomène des mutations dirigées des bactéries, par des principes actifs de nature désoxyribonucléique, conduit à faire de l'acide désoxyribonucléique du noyau bactérien et plus généralement du noyau de toutes les cellules le dépositaire des caractères héréditaires de l'espèce. Chaque gène aurait pour constituant essentiel une macromolécule d'un acide désoxyribonucléique particulier. S'il en va bien ainsi, chez une même espèce vivante, la quantité absolue d'acide désoxyribonucléique doit être la même pour tous les noyaux de toutes les cellules, à l'exception des gamètes (haploïdes) qui doivent en contenir deux fois moins que les cellules diploïdes au repos, chez lesquelles les chromosomes n'ont pas subi de duplication préalable à la mitose. Comme on l'a vu, nos résultats semblent s'accorder parfaitement avec cette conception. Ils amènent ainsi un intéressant argument d'ordre analytique à l'appui de la notion de l'acide désoxyribonucléique dépositaire des caractères héréditaires.

Certes, il serait scabreux de généraliser trop vite ces résultats préliminaires et d'affirmer que toujours tous les noyaux des cellules somatiques d'une même espèce animale renferment exactement la même quantité d'acide désoxyribonucléique, double exact de celle que contiennent les gamètes de la même espèce; quoiqu'il en soit, l'analyse du noyau à travers la série des êtres vivants ne peut manquer d'apporter des données vraiment intéressantes concernant ce chapitre encore si neuf de la biochimie de l'hérédité. Nous nous proposons d'étendre progressivement nos recherches à d'autres espèces animales: autres mammifères (y compris l'homme)-oiseaux, vertébrés inférieurs et invertébrés. Nous projetons, en particulier, de rechercher sur du matériel approprié (par exemple gamètes d'échinodermes) si, dans une même espèce, ovules et spermatozoïdes contiennent la même teneur en acide désoxyribonucléique. Les tissus

végétaux et les microorganismes, spécialement les bactéries, retiendront également notre attention. Nous pouvons déjà dire que chez le Colibacille, le noyau bactérien<sup>1</sup>, dont le diamètre est de l'ordre du demi-micron, renferme une quantité d'acide désoxyribonucléique, de l'ordre de  $10^{-8} \gamma$  au lieu de  $10^{-6} \gamma - 10^{-5} \gamma$  chez les mammifères.

R. VENDRELY et C. VENDRELY

Laboratoire de biologie bactérienne du Centre national de la recherche scientifique et Institut de bactériologie de la Faculté de médecine de Strasbourg, le 17 juillet 1948.

#### Summary

Techniques are described for the isolation of nuclei from animal cells and for the determination of the desoxyribonucleic acid content for each nucleus. These techniques have already been used in order to study a few mammalian species. From the first results (especially in calf, ox and bull), it seems to appear that the nucleus of the somatic cells contains constantly the same amount of desoxyribonucleic acid, whatever tissue and animal we studied within the same species; and this amount is just the double of that of the haploid cells (spermatozoa) in the same animal. This result constitutes a strong argument, from the analytical point of view, for the theory according to which the desoxyribonucleic acid is considered to be the substrate of the hereditary characters of the species.

<sup>1</sup> Voir par exemple: A. BOIVIN, R. TULASNE et R. VENDRELY, CR. Acad. Sci. 225, 703 (1947). - A. BOIVIN, R. VENDRELY et R. TULASNE, Arch. Sci. Physiol. 1, 85 (1947). - A. BOIVIN, R. TULASNE, R. VENDRELY et R. MINCK, Arch. Sci. Physiol. 1, 307 (1947).

#### Importance de la lysine et du tryptophane dans la nutrition de *Tenebrio molitor* L.

Il est bien établi que la lysine et le tryptophane sont deux acides aminés essentiels pour les Mammifères (OSBORNE et MENDEL<sup>1</sup>, ROSE et al.<sup>2</sup>, etc.), les Oiseaux (ALMQVIST<sup>3</sup>, GRAU et al.<sup>4</sup>, etc.) ainsi que pour différents Micro-organismes (cf. BARTON-WRIGHT<sup>5</sup>). On reste mal renseigné sur l'importance éventuelle de ces substances dans la nutrition des Insectes. Ce que l'on sait de précis se limite ici aux observations de MICHAELBACHER, HOSKINS et HERMS<sup>6</sup>, pour *Lucilia sericata*, et à celles de LAFON<sup>7</sup>, pour *Drosophila*, suivant lesquelles le tryptophane et

<sup>1</sup> T. B. OSBORNE et L. B. MENDEL, J. Biol. Chem. 17, 325 (1914).

<sup>2</sup> W. C. ROSE et al., Science 86, 298 (1937); 90, 186 (1939), usw.

<sup>3</sup> H. J. ALMQVIST, Fed. Proc. 1, 269 (1942); Trans. Am. Ass. Cereal Chemists 3, 158 (1945).

<sup>4</sup> C. R. GRAU et al., Poultry Science 25, 529 (1946).

<sup>5</sup> E. C. BARTON-WRIGHT, Analyst 71, 267 (1946).

<sup>6</sup> A. E. MICHAELBACHER, W. M. HOSKINS et W. B. HERMS, J. Exp. Zool. 64, 109 (1932).

<sup>7</sup> M. LAFON, Ann. Physiol. Physico-Chim. Biol. 15, 215 (1939).

<sup>1</sup> A. BOIVIN, A. DELAUNAY, R. VENDRELY et Y. LEHOULT, Exper. 1, 334 (1945); 2, 139 (1946); CR. Acad. Sci. 221, 718 (1945). - A. BOIVIN, R. VENDRELY et Y. LEHOULT, CR. Acad. Sci. 221, 646 (1945). - A. BOIVIN et R. VENDRELY, Exper. 3, 32 (1947). - A. BOIVIN, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 12, 7 (1947).