

the late prophase nucleus<sup>1</sup>. It may well be that during telophase spindle material becomes intimately associated with the chromatin, and that during prophase it is gradually released, as the chromosomes shorten, to give rise to "karolymph", which in turn gives rise to a spindle after nuclear membrane breakdown. That spindle material is in some way connected with telophase change can be further inferred from observations on cells in which the spindle has been altered experimentally. HUGHES<sup>2</sup> and GAULDEN<sup>3</sup> found that the behavior of the spindle material determines the time of onset of telophase change in cells recovering from complete destruction of a functional spindle by hypotony and by heat. If the spindle re-forms, onset of telophase change is delayed until the chromosomes have reached the poles of the spindle at anaphase. If, however, the spindle does not re-form, the chromosomes show telophase change immediately. It appears that telophase change occurs when the chromosomes are closely associated with disorganized spindle material, a situation which normally obtains at the beginning of telophase.

The role of the chromosome itself in the initiation and progression of telophase change remains obscure. The evidence herein presented shows, however, that the chromosomes are not solely responsible for the changes which are manifest in them at telophase, but that they are dependent to some extent on other factors.

MARY ESTHER GAULDEN

Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn., U.S.A., June 21, 1953.

### Zusammenfassung

Extranukleares Chromatin, in der Form azentrischer Fragmente oder Teile ungebrochener Chromosomen, welche aus der Kernregion von Heuschrecken-Neuroblasten herausragen, unterliegt nicht gleichzeitig mit dem intranuklearen Chromatin den telophasischen Veränderungen. Der oder die für die Telophaseveränderungen vor allem verantwortlichen Faktoren scheinen in der Kernregion der Zelle lokalisiert zu sein. Es werden Belege dafür gegeben, dass die Chromosomen während der Telophase sich bedeutend vergrössern, und es wird die Ansicht vertreten, dass im Spindelmaterial, zum Teil wenigstens, die für die Schwellung der Chromosomen verantwortliche Substanz zu sehen ist.

<sup>1</sup> J. G. CARLSON and A. HOLLANDER, J. Cellular Comp. Physiol. 31, 149 (1948). - M. E. GAULDEN and J. G. CARLSON, Exptl. Cell Res. 2, 416 (1951).

<sup>2</sup> A. HUGHES, Quart. J. Microscop. Sci. 93, 207 (1952).

<sup>3</sup> M. E. GAULDEN, J. Tenn. Acad. Sci. 23, 162 (1948).

### Analyse de l'induction neurale par autoradiographie

Les expériences de BRACHET<sup>1</sup> ont montré clairement, quoique de manière indirecte, que l'induction neurale s'accompagne d'une migration de granules, colorables au rouge neutre, qui passent du chordoblaste dans le neuroblaste.

Il nous a semblé utile d'étendre ces expériences en utilisant la méthode autoradiographique pour la mise en évidence d'une éventuelle diffusion des macromolécules marquées de l'organisateur vers l'ectoderme.

<sup>1</sup> J. BRACHET, Exper. 6, 56 (1950).

Nous avons, dans ce but, utilisé la technique des émulsions nucléaires qui permet une localisation précise et une estimation quantitative de l'isotope tant dans le greffon que dans l'hôte.

Plusieurs séries d'expériences ont porté sur des embryons de Batraciens de différentes espèces (Pleurodèles, Axolotl, *Rana fusca*, *Rana temporaria*); elles ont consisté, soit en greffes d'organisateurs marqués dans des embryons entiers, soit en explantations: dans ce cas le neuroblaste marqué a été accolé à de l'épiblaste non marqué et vice versa.

Un essai préliminaire a montré que le glycocolle pénètre mal dans les embryons entiers conformément aux résultats déjà obtenus par FRIEDBERG et EAKIN<sup>1</sup> et par BRACHET et BRYGIER<sup>2</sup> au moyen d'autres méthodes. Nous avons donc placé des organisateurs isolés dans le milieu radioactif.

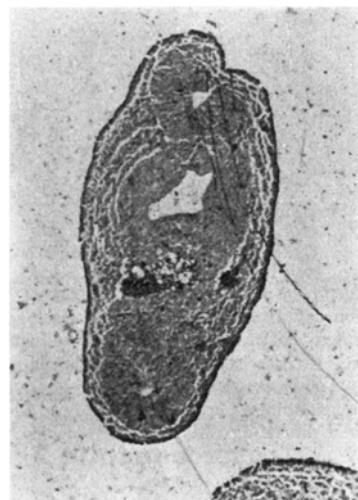


Fig. 1. Induction obtenue par la greffe d'un organisateur de *Rana fusca* dans un embryon d'Axolotl. - La préparation histologique est recouverte d'émulsion photographique puis colorée au vert de Méthyle-Pyronine.

Les images les plus convaincantes ont été obtenues dans les cas où l'hôte et le greffon provenaient d'espèces différentes et où ils étaient donc aisément reconnaissables. En voici un exemple: les organisateurs de jeunes gastrulas de *Rana fusca* ont été prélevés stérilement et soumis à un séjour de 3 h dans de la solution de HOLTFRERER stérile additionnée de 0,5  $\mu\text{M}/\text{cm}^3$  de glycine- $\text{I-}^{14}\text{C}$ .

Après lavages soigneux et répétés dans du HOLTFRERER contenant du glycocolle non marqué, les greffons de *Rana fusca* ont été implantés dans des blastulas avancées d'Axolotl. Les embryons ont été fixés après 2 et 3 jours de développement, puis enrobés et coupés à 10  $\mu$  d'épaisseur.

Les coupes ont été alors recouvertes d'émulsion photographique G<sub>5</sub> ILFORD "in gel form", suivant la technique exposée antérieurement<sup>3</sup>. Après 3 à 5 jours d'exposition en chambre noire, les préparations ont été développées, fixées et colorées à travers la gélatine par la méthode d'UNNA (Fig. 1).

Dans les cas positifs (50%), on observe une radioactivité intense dans le greffon (Fig. 2). Une activité significative se manifeste aussi dans le système nerveux

<sup>1</sup> F. FRIEDBERG et R. M. EAKIN, J. exp. Zool. 110, 33 (1949).

<sup>2</sup> J. BRACHET et J. BRYGIER (communication personnelle).

<sup>3</sup> A. FICQ, F. GAVOSTO et M. ERRERA, Exper. Cell. Res. (sous presse).

induit et dans la chorde, quand celle-ci existe; cette activité est très nettement localisée dans les noyaux (Fig. 3). Une activité moindre s'observe dans le système nerveux primaire; en général, on retrouve des traces d'électrons dans toutes les régions de l'embryon où la morphogénèse est active. Dans les cas où le greffon s'est autodifférencié, il présente une activité remarquable, dans la chorde notamment.

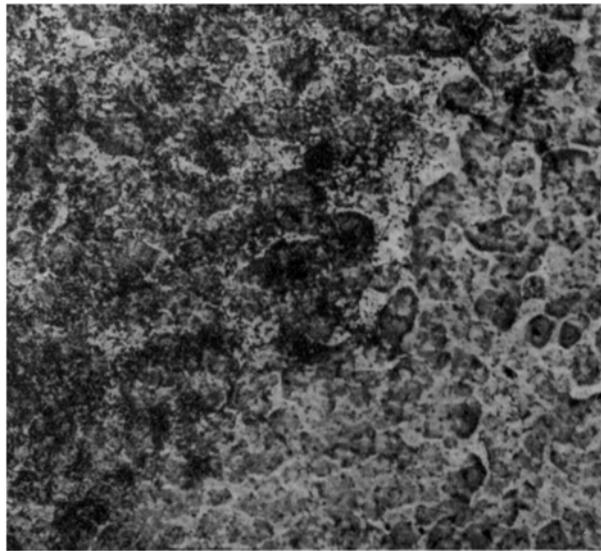


Fig. 2. Organisateur d'Axolotl marqué à la Glycine-I-<sub>14</sub>C accolé à de l'ectoblaste. On observe une intense radioactivité dans les noyaux du greffon.

Pour distinguer la radioactivité de la glycine incorporée respectivement par les protéines et par les acides nucléiques, une série de coupes alternantes ont été hydrolysées par l'HCl N, pendant 5 min, à 60°, suivant la méthode de VENDRELY<sup>1</sup>. Une diminution de la radioactivité, qui atteint 50 % de la valeur initiale, s'observe tant dans le greffon que dans les organes en formation.

Pour éliminer spécifiquement l'activité imputable à l'acide ribonucléique, nous avons traité une série de coupes à la ribonucléase selon la méthode de BRACHET<sup>2</sup>: l'autoradiographie de ces préparations accuse une diminution de 32 % des traces. On peut en conclure que, lors de l'hydrolyse par l'HCl, 18 % des traces éliminées proviennent du D.N.A. et d'une petite fraction protéique. Ce résultat se retrouve aisément en traitant des coupes à la ribonucléase d'abord, puis à l'HCl N à 60° pendant 5 min.

Une autre série d'expériences a été effectuée sur le même matériel et dans des conditions analogues, l'organisateur étant marqué, cette fois, par de l'acide orotique 2-<sub>14</sub>C-6-carboxylique.

L'incorporation dans le greffon est sensiblement moindre que dans le cas de la glycine, mais la radioactivité induite se retrouve dans les mêmes régions à morphogénèse active; les noyaux sont particulièrement actifs et on y remarque assez souvent des traces émises par les nucléoles. Quelques électrons épars s'observent cependant entre les plaquettes vitellines.

Lorsque les coupes de cette série sont soumises à l'action de la ribonucléase, la radioactivité devient de l'ordre de celle du back-ground: l'incorporation, dans ce

cas, se produit donc spécifiquement dans l'acide ribonucléique.

Nous avons tenté, enfin, quelques expériences d'induction dans le cas d'explantats en accolant des organisateurs d'Axolotl avec de l'ectoblaste de *Rana temporaria*, après avoir marqué à la glycine-I-<sub>14</sub>C soit l'un, soit l'autre des fragments.

On observe alors une forte radioactivité dans les noyaux du fragment traité et une diffusion modérée de la glycine vers l'ectoblaste ou le neuroblast accolé. Toutefois, nous n'avons pas obtenu, dans ces conditions, de réponses morphologiques nettes, même dans le cas de témoins où l'explantat n'était pas radioactif.

Les coupes traités à la ribonucléase et à l'HCl N à 60° pendant 5 min, montrent des diminutions d'activité analogues à celles qui ont été observées dans les embryons entiers.

La glycine libre est, semble-t-il, totalement éliminée des greffons par les lavages au glycocolle non marqué: en effet, des fragments bouillis, traités de la même manière que les embryons en expérience, ne présentent qu'une radioactivité tout à fait négligeable, conformément d'ailleurs aux résultats de FRIEDBERG et EAKIN<sup>1</sup>.

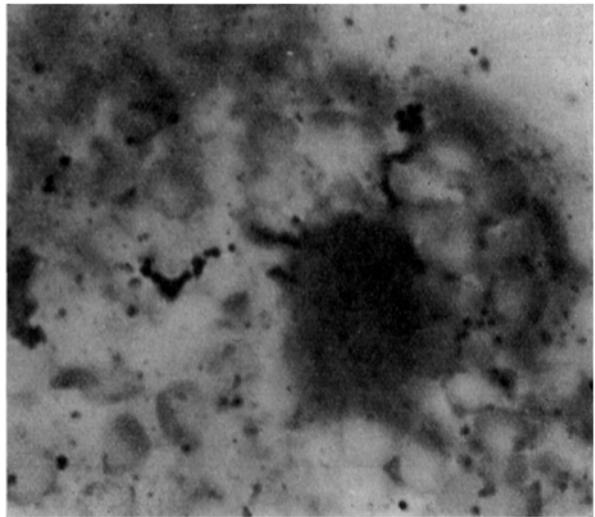


Fig. 3. Deux électrons émis par un noyau.

On peut donc attribuer la radioactivité observée dans les autoradiographies à des substances de poids moléculaire élevé, qu'il s'agisse d'acides nucléiques ou de protéines. Il faut dès lors conclure que l'organisateur, qu'il soit marqué par l'acide orotique ou par le glycocolle, laisse diffuser de telles substances dans les organes qu'il induit.

(Mme) A. FICQ

*Laboratoire de morphologie animale, Université de Bruxelles, le 7 juillet 1953.*

#### Summary

Neural induction is accompanied by a migration of granules from the organizer to the reacting ectoblast (BRACHET). The radioautographs of embryos or explants of amphibians seem to show that such a migration to the induced organs takes place when a marked organizer is grafted in a non-radioactive host.

Substances of high molecular weight (proteins or nucleic acids) diffuse from an organizer tagged either with radioactive glycine or with radioactive orotic acid.

<sup>1</sup> F. FRIEDBERG et R. M. EAKIN, J. exp. Zool. 110, 33 (1949).

<sup>2</sup> R. VENDRELY et F. LIPARDY, C. r. Acad. Sci. 223, 342 (1946).

<sup>2</sup> J. BRACHET, Arch. Biol. 53, 207 (1942).