

RADIOBIOLOGICA LATINA

Archivio Internazionale di Radiobiologia e di Medicina nucleare
Archives Internationales de Radiobiologie et de Médecine nucléaire
Archivio Internacional de Radiobiologia y de Medicina nuclear
International Archives of Radiobiology and Nuclear Medicine
Internationales Archiv für Radiobiologie und Nuklearmedizin

M. (*) et J. MOUTSCHEN-DAHMEN et W. G. VERLY

MISE EN EVIDENCE DU MYLERAN TRITIE
DANS LES CELLULES DE
VICIA FABIA L.

Estratto dal Vol. IV, fasc. 3°, 1961

MISE EN EVIDENCE DU MYLERAN TRITIÉ
DANS LES CELLULES DE
VICIA FABA L.

(avec 4 figures dans le texte)

par

M. (*) et J. MOUTSCHEN-DAHMEN et W. G. VERLY (**)

(En rédaction le 12 septembre 1961)

Au cours d'un travail précédent (J. et M. MOUTSCHEN-DAHMEN, W. G. VERLY et G. KOCH, 1960), nous avons montré qu'il est possible de marquer des noyaux de racines de *Vicia faba* au moyen de Myleran tritié. Cette possibilité a pu ensuite être étendue à d'autres systèmes biologiques tant animaux que végétaux (J. et M. MOUTSCHEN-DAHMEN, 1962). Le marquage des cellules diffère cependant nettement d'un matériel à l'autre.

En règle générale, un certain nombre de grains a pu être relevé au-dessus des noyaux mais cependant, le cytoplasme semble réagir aussi. Ces faits ont incité de nouvelles recherches sur les réactions d'alkylation possibles *in vivo*.

W. G. VERLY *et al.* (1961) ont mis en évidence une réaction du Myleran avec les nucléo-protéines *in vivo*, dans la graine de *Vicia*.

Par ailleurs, sur le plan cytologique, l'action du Myleran pose encore de nombreux problèmes (J. et M. MOUTSCHEN-DAHMEN, 1962).

Une mise au point paraissait dès lors nécessaire, tentant de connecter quelques résultats autoradiographiques, cytologiques et chimiques actuellement acquis.

MATERIEL ET METHODE

Trois séries expérimentales ont été réalisées. La première consiste en un traitement de graines sèches, la seconde utilisant des graines prégermées et la troisième des racines.

(*) Chercheur agréé à l'Institut Interuniversitaire des Sciences Nucléaires.

(**) Associé au Fond National belge de la Recherche Scientifique.

Pour le traitement de graines sèches, la technique ne diffère pas de celle qui a été exposée dans notre précédent travail.

Cependant, un certain nombre de points sont à relever. Au cours des expériences actuelles, seul, le premier cycle mitotique consécutif au traitement a été considéré, alors qu'au cours des premières expériences, nos observations pouvaient s'étendre sur plusieurs cycles. Ce fait peut expliquer certaines différences relevées. L'activité spécifique du Myleran tritié est de 105 mC par millimole.

Nous n'avons guère constaté de différences relatives à l'utilisation de la méthode de Feulgen, notamment à l'hydrolyse, comme au cours de notre expérience précédente. Cependant, le temps d'hydrolyse a été réduit au minimum. Il ne fait guère de doute que la fixation et l'hydrolyse éliminent la totalité du Myleran qui n'a pas réagi.

Dans certains cas, où la coloration ne paraissait pas suffisante, une surcoloration a été réalisée en immergeant les autoradiographies dans une solution saturée de thionine pendant une durée de 1 à 2 minutes, suivie de lavage à l'eau distillée. Pour les autoradiographies, nous avons utilisé les plaques Kodak AR 10.

Dans la seconde série, les graines sont prégermées sur papier filtre humecté d'eau distillée à $21 \pm 1^\circ \text{C}$ pendant des périodes variables. Après prégermination, les graines sont traitées par le Myleran tritié pendant 3 heures. La suite des manipulations ne diffère pas de celles effectuées pour les graines traitées sèches.

Dans la troisième série expérimentale, des racines de 60-70 heures (env. 1 cm de longueur) ont été traitées par la même dose et pendant un même temps que pour les expériences précédentes. Ces racines sont fixées 24 heures après traitement et manipulées comme dans les deux autres séries expérimentales.

Les méthodes de détection et de comptage des lésions ont déjà été mentionnées (J. et M. MOUTSCHEN-DAHMEN, 1958).

RESULTATS

A) MARQUAGE DES NOYAUX ET DES MICRONOYAUX A LA SUITE DE TRAITEMENTS DE GRAINES ET DE RACINES.

Dans les expériences réalisées avec des graines non prégermées, nous avons constaté que le marquage des cellules méristématiques est toujours faible.

Exceptionnellement, comme au cours de notre précédent travail (loc. cit.), nous avons relevé un marquage très intense de certaines cellules méristématiques de l'ordre de 22 ± 2 grains pour une surface de $20 \mu^2$ de noyau. Ce résultat est difficilement reproductible. Au cours des expériences actuelles, les noyaux sont statistiquement marqués comme l'indique le graphique (Fig. 1).

Dans les expériences réalisées avec prégermination, les cellules sont toujours beaucoup plus marquées. Le graphique 2 (Fig. 1) montre que le nombre de grains comptés au-dessus des cellules méristématiques est 10 fois plus intense dans les racines provenant de graines prégermées pendant 15 heures que dans les racines provenant de graines sèches traitées.

Les graphiques 1 à 6 (Fig. 1) établissent une comparaison entre les distributions de fréquences des grains comptés respectivement au-dessus du noyau et du cytoplasme dans les trois séries expérimentales. On voit que :

1) Les distributions des grains au-dessus du cytoplasme et au-dessus du noyau sont du même type dans les expériences sur racines et sur graines prégermées.

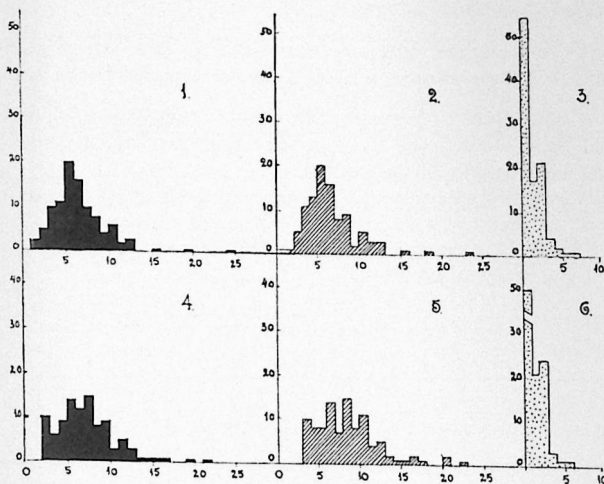


Fig. 1 - Graphiques 1-6: Distributions des fréquences des grains
1-3: au-dessus du noyau.

4-6: au-dessus du cytoplasme.

En noir: graines traitées prégermées.

En hachuré: racines traitées.

En pointillé: graines traitées non prégermées.

2) Dans ces deux séries expérimentales, la distribution des grains est moins régulière au-dessus du cytoplasme qu'au-dessus du noyau.

3) Dans la série expérimentale sans prégermination, la distribution des grains est différente des distributions observées dans les deux autres séries. Un nombre beaucoup plus élevé de cellules ne se montre pas marqué (22%). L'allure des distributions est la même au-dessus du noyau et au-dessus du cytoplasme.

4) Dans les graphiques 1 et 2 (Fig. 1), on note un certain nombre de noyaux au-dessus desquels le nombre de grains est nettement plus élevé, spécialement dans le cas des racines traitées (Dans ce cas: 3,5%).

Nous avons constaté que, dans ces cas, il existe des groupements de grains au-dessus de certains endroits de la surface nucléaire. Les grains sont alors groupés d'une manière variable et il n'a pas été possible d'identifier la structure nucléaire sous-jacente. Il ne s'agit cependant jamais du nucléole.

De tels groupements de grains sont exceptionnellement observés au-dessus du cytoplasme.

Concernant les micronoyaux, les conclusions tirées de l'expérience précédente restent valables, à savoir:

a) Au-dessus des micronoyaux nucléolés, on rencontre un certain nombre de grains du même ordre de grandeur qu'au-dessus des noyaux.

b) Par contre, au-dessus des micronoyaux pycnotiques, la fréquence des grains est toujours basse et un certain nombre de ces micronoyaux pycnotiques n'est pas marqué.

Ces constatations nous ont amenés à penser que le Myleran ne réagit pas uniformément avec toutes les parties des chromosomes.

Le tableau I montre que ces constatations peuvent être étendues aux trois séries expérimentales.

TABLEAU I. - Marquage des micronoyaux dans les trois séries expérimentales (p. 500 micronoyaux).

MICRONOYAUX	sans prégermination (graines)		avec prégermination (graines)		racines	
	% marqués	moyenne de grains par mi- cronoyau	% marqués	moyenne de grains par mi- cronoyau	% marqués	moyenne de grains par mi- cronoyau
Nucléolés	30,6	0,08	70	1,8	79,6	1,6
Pycnotiques	0,2	0,004	3,5	0,06	4	0,04

B) MARQUAGE DES CHROMOSOMES A LA SUITE DE TRAITEMENTS DES GRAINES ET DES RACINES.

Comme pour les noyaux, les chromosomes marqués dans les racines provenant de graines non prégermées sont rares.

Par contre, dans les racines provenant de graines prégermées ainsi que dans les racines directement traitées, on note un taux parfois assez élevé de grains au-dessus de cellules à divers stades du cycle mitotique.

Le tableau II compare les résultats obtenus pour les trois séries expérimentales.

TABLEAU II. - Comparaison des fréquences de grains au-dessus des cellules au cours d'un cycle mitotique pour 3 séries expérimentales.

$$\sigma = \pm 2 \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n(n-1)}} \quad (\text{moyenne pour 500 cellules environ})$$

Graines prégermées 15 heures		Quiescents	Prophase	Métaphase	Anaphase
	Chromatine	6,62 ± 0,50	10,6 ± 1,58	5,4 ± 0,56	6,5 ± 1,14
Cytoplasme	6,47 ± 0,76	7,55 ± 1,64	11,3 ± 1,14	11,3 ± 0,80	
Total	13,09	18,15	16,7	17,8	
Racines traitées	Chromatine	6,17 ± 0,52	8,37 ± 0,84	5,26 ± 0,72	4,63 ± 0,6
	Cytoplasme	8,05 ± 1,0	7,96 ± 0,82	8,90 ± 0,84	9,79 ± 0,84
	Total	14,22	16,33	14,16	14,42
Graines non prégermées	Chromatine	0,88 ± 0,08	0,64 ± 0,08	0,54 ± 0,06	0,49 ± 0,06
	Cytoplasme	0,86 ± 0,08	0,71 ± 0,08	0,90 ± 0,06	0,75 ± 0,08
	Total	1,74	1,35	1,44	1,24

Background: 0,90 ± 0,40 pour une surface correspondant à la surface cellulaire moyenne.

On voit que:

1) les modifications des taux de grains comptés pendant le cycle mitotique sont les mêmes pour les expériences sur graines avec prégermination et sur racines. Par contre, elles sont différentes pour les expériences avec graines non prégermées.

2) pour les expériences sur graines prégermées et sur racines, on voit que le nombre de grains comptés au-dessus des cellules en mitose est supérieur au nombre de grains comptés au-dessus des cellules à un stade quiescent. Ce fait s'avère d'autant plus exact que le nombre de grains comptés au-dessus des cellules quiescentes a probablement une valeur maximale par suite de l'existence de noyaux à valeur tétraploïde se formant par voie endomitotique. (S. R. PELC, 1959).

3) les nombres de grains comptés au-dessus des cellules à différents stades du cycle mitotique sont du même ordre de grandeur. Dans

ce cas, il ne s'agit évidemment jamais de valeurs tétraploïdes puisqu'il est possible de compter le nombre de chromosomes.

4) en prophase, les nombres de grains comptés au-dessus des chromosomes sont toujours supérieurs aux nombres de grains comptés dans les phases ultérieures. De plus, le nombre de grains comptés au-dessus de chromosomes est supérieur au nombre de grains comptés au-dessus du cytoplasme.

5) en métaphase (Fig. 2 : 3 et 4) ainsi qu'en anaphase, les nombres de grains comptés au-dessus des chromosomes sont inférieurs aux nombres de grains comptés au-dessus du cytoplasme. Pour ces deux phases, les valeurs comptées sont du même ordre de grandeur.

6) pour les expériences effectuées sur graines non prégermées, les nombres de grains sont environ dix fois moins élevés que dans les deux autres séries. Ils sont du même ordre de grandeur pour toutes les phases du cycle mitotique.

C) ESSAI DE LOCALISATION DANS LES CHROMOSOMES.

Dans un travail précédent (*loc. cit.*), nous avons posé la question de savoir si, par autoradiographie, le Myleran pouvait être localisé dans les chromosomes aux endroits où il casse ces derniers. Cette étude aboutit, dans certains cas au moins, à une évidence négative.

Comme dans les expériences sur graines sans prégermination, le taux de grains comptés au-dessus des chromosomes est trop faible pour permettre une statistique efficace, nous n'avons considéré que le marquage de graines prégermées.

TABLEAU III. - Localisation des grains au-dessus des chromosomes au cours des expériences avec 15 heures de prégermination (500 cellules environ).

	par chromos. cassé	par chromos. non cassé	par chromos. avec réunion	au-dessus des cassures	au-dessus des réunions	par fragment en anaphase
des grains	0,40	0,45	0,38	0,04	0,10	0,34
% de marqués moyenne chromos.	24,2	21,6	26	5,4	10,8	24,6

Le tableau III montre que :

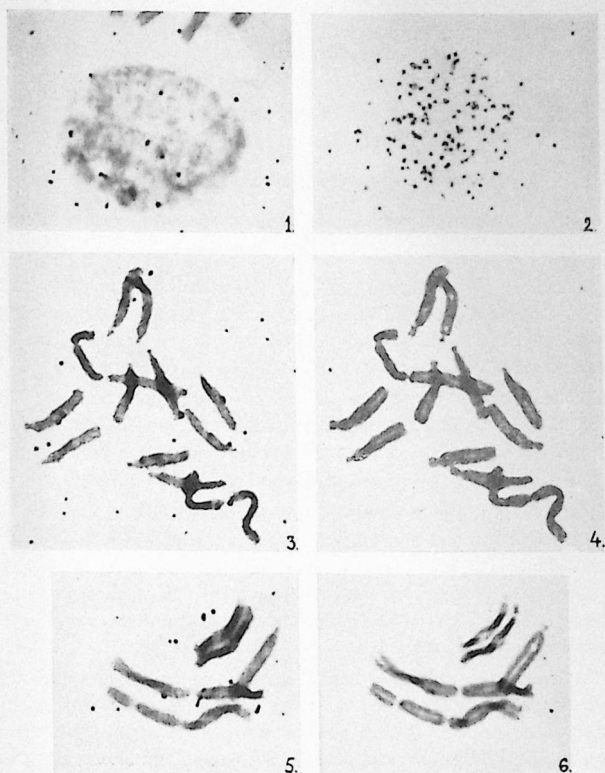


Fig. 2 - 1. - Noyau marqué; traitement après prégermination.

2. - Prophase marquée (cliché au niveau des grains).

3. - Marquage d'une cellule en métaphase, au niveau des grains.

4. - Id., au niveau des chromosomes.

5. - Marquage du chromosome M.

6. - Id., au niveau du chromosome. (gr. X 2.000).

1) Les nombres de grains comptés au-dessus des chromosomes lésés ne sont pas supérieurs aux nombres de grains comptés au niveau des chromosomes non visiblement lésés.

2) Les pourcentages de chromosomes lésés marqués ne sont pas supérieurs aux pourcentages de chromosomes non visiblement lésés et marqués.

3) Les pourcentages de grains localisés au-dessus ou au voisinage des cassures et des réunions sont faibles.

En conclusion :

a) la majeure partie des lésions peut exister sans qu'il y ait marquage au niveau de la lésion ;

b) sans qu'il y ait marquage du chromosome lésé ;

c) un marquage peut exister au-dessus de chromosomes non visiblement lésés.

Comme il a été démontré (J. et M. MOUTSCHEN-DAHMEN, 1958) qu'une majeure partie des lésions dues au Myleran s'effectue dans des régions hétérochromatiques du génome de *Vicia faba*, nous avons systématiquement cherché à localiser les grains au-dessus de ces zones.

Pour la région du chromosome M désignée par 2 par J. Mc LEISH (1953) (Zone β de MOUTSCHEN-DAHMEN), les fréquences des grains ont pu être comparées aux autres régions du chromosome M.

Le pourcentage des grains localisés au-dessus de cette zone est de 17% de tous les grains localisés au-dessus du génome.

Les figures 2: 5-6 montrent un exemple de marquage au-dessus de cette région.

Dans l'appréciation de l'intensité du marquage, nous n'avons tenu compte que des zones marquées non cassées, puisque le taux de zones marquées et cassées est faible.

Pour les chromosomes M dont l'identification est toujours plus aisée, nous avons pu estimer à 70% environ le pourcentage de grains localisés au-dessus de ce chromosome pouvant provenir de régions hétérochromatiques. Il reste certain que dans ce chromosome au moins, les grains peuvent être localisés ailleurs qu'au-dessus des régions hétérochromatiques connues.

D) RELATIONS ENTRE L'INTENSITE DU MARQUAGE NUCLEAIRE ET DES LESIONS CHROMOSOMIQUES.

En vue de simplifier considérablement le problème de l'estimation des taux de lésions chromosomiques à mettre en relation avec le marquage des noyaux, nous avons estimé celles-ci en anaphase. Les fluctuations de différents types de lésions chromosomiques ont été mesurées en métaphase au cours d'un article précédent (J. et M. MOUTSCHEN-DAHMEN, sous presse). Il est bien connu que les fragments anaphasiques peuvent avoir des origines diverses. Dès lors, les fluctuations des taux de ces fragments ne peuvent nous donner des informations que sur le taux global des lésions.

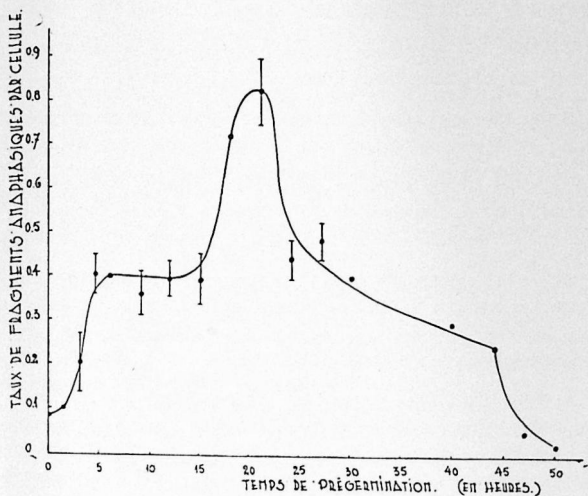


Fig. 3 - Taux de fragments anaphasiques par cellule observés après des temps de prégermination croissants.

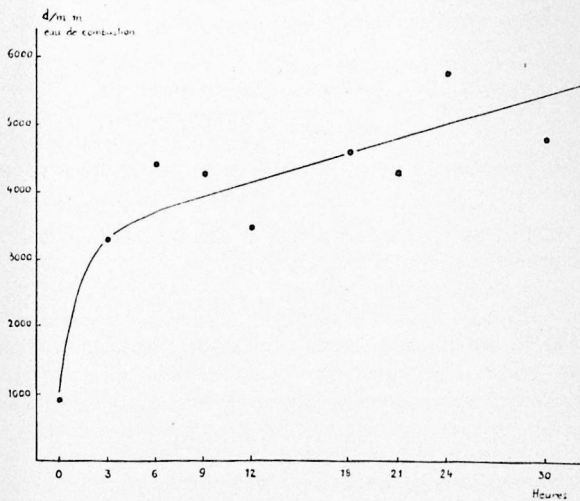


Fig. 4 - Quantité de Myleran tritité absorbé par la graine exprimée en désintégrations par minute par milligramme d'eau de combustion après des temps croissants de prégermination.

Le graphique de la fig. 3 montre que :

1) Les taux de fragments anaphasiques sont accrus lorsque les temps de prégermination sont accrus jusqu'à 6 heures de prégermination.

2) La courbe atteint un plateau entre 6 et 15 heures de prégermination.

3) A des temps de prégermination supérieurs à 15 heures, on obtient une très nette augmentation des taux de fragments anaphasiques. On atteint un maximum aux environs de 21 heures de prégermination.

4) On observe ensuite entre 21 et 24 heures de prégermination, une décroissance brusque du taux de lésions suivie d'une lente décroissance.

On observe ainsi des taux de lésions inférieurs à ceux obtenus au niveau du plateau.

5) Pour des temps de prégermination supérieurs à 44 heures, les taux de lésions diminuent alors très fortement et atteignent un niveau faible, inférieur au niveau initial. Pour apprécier l'intensité des lésions chromosomiques, nous avons exclusivement tenu compte des fragments et non des ponts chromosomiques comparativement beaucoup plus rares (J. et M. MOUTSCHEN-DAHMEN, *loc. cit.* et à publier).

On peut donc distinguer 5 périodes :

a) Une période d'accroissement des lésions suivant approximativement l'équation

$$N = N_0 (1 - e^{-\mu x}) \quad (\text{de } 0 \text{ à } 6 \text{ heures});$$

b) Une période d'égale sensibilité au toxique (de 4½ à 15 heures).

c) Une période pendant laquelle la sensibilité est fortement accrue (de 15 à 21 heures).

d) Une période pendant laquelle la sensibilité diminue très fortement suivant une équation proche de

$$N = N_0 e^{-\mu x} \quad (\text{de } 24 \text{ à } 44 \text{ heures}).$$

e) Une période de très faible sensibilité correspondant au début de l'apparition des prophase (de 44 à 50 heures).

L'absorption du Myleran par la graine prégermée a été étudiée et est résumée dans la fig. 4. On voit que l'absorption est tout d'abord fortement accrue pour des temps de prégermination de 0 à 6 heures.

Elle s'accroît ensuite beaucoup plus lentement pour des temps de prégermination de 6 à 30 heures.

Il s'ensuit que l'accroissement considérable des taux de fragments anaphasiques observé entre 15 et 24 heures de prégermination ne peut

pas, dans sa totalité tout au moins, être expliqué par un accroissement d'absorption de la substance mais par un accroissement de la sensibilité au Myleran durant cette période.

Cette période de sensibilité accrue correspond probablement à la période de reproduction du chromosome. La diminution ultérieure des taux de fragments doit correspondre au fait qu'une proportion de plus en plus grande de cellules a dépassé ce stade au moment où elles sont touchées par la substance.

Dans leur ensemble, ces résultats semblent bien concorder avec les données de l'autoradiographie.

De la comparaison des graphiques (fig. 3 et 4) et des données du tableau II, il ressort, en effet, que :

1) entre 0 et 15 heures, l'absorption du Myleran comme le taux de lésions sont multipliés par un facteur 4 ;

2) entre 0 et 15 heures, les nombres de grains comptés au-dessus des cellules sont multipliés par un facteur 7 (cf. tableau II). Cette valeur supérieure laisserait supposer que les cellules méristématiques absorbent davantage, la courbe d'absorption étant tracée à partir d'embryons entiers. Le fait que le taux de fragments est seulement multiplié par un facteur 4 s'explique du fait que ces relevés ne tiennent pas compte des réunions (dont on sait, d'autre part, qu'elles peuvent être nombreuses pour ce temps de prégermination (J. et M. MOUSCHEN-DAHMEN, *loc. cit.*) ;

3) entre 10 et 21 heures de prégermination, les taux de grains au-dessus des cellules ne sont pas augmentés, pas plus que l'absorption évaluée en désintégration/minute.

Par contre, le taux de fragments en anaphase est encore multiplié par un facteur 2, ce qui ne peut s'expliquer que par un accroissement de sensibilité au toxique.

DISCUSSION

On ne peut manquer de constater des différences essentielles entre les expériences réalisées avec et sans prégermination, tant sur le plan autoradiographique que sur le plan cytologique.

La vitesse d'absorption accrue dans les graines prégermées pourrait expliquer un taux accru de lésions. Elle ne peut cependant pas expliquer que ces lésions changent de type. En effet, J. et M. MOUSCHEN-DAHMEN (*loc. cit.*) ont fait remarquer que, sans prégermination, la grosse majorité des lésions observées à la suite de traitements par le Myleran est de type chromosomique alors qu'il est de type chromatidique lorsque le temps de prégermination est suffisant. Le second accroissement des taux de frag-

ments en anaphase est donc interprété comme étant dû à une néogenèse de lésions chromatidiques et non à un accroissement d'absorption.

L'autoradiographie nous apprend qu'il existe des lieux de réaction du Myleran dans le cytoplasme aussi bien que dans le noyau. Cette constatation a, d'autre part, été étendue à une vingtaine de matériaux biologiques animaux et végétaux (J. et M. MOUTSCHEN-DAHMEN, 1962). W. G. VERLY *et al.* (1960 a et b) ont démontré qu'une faible partie du Myleran seulement réagissait avec les nucléoprotéines et spécialement avec l'A.D.N. K. A. STACEY (1958) ont montré, qu'*in vitro*, le Myleran réagit avec divers groupes des protéines. Il existe suffisamment de groupes libres de ce type dans le cytoplasme pour expliquer une réaction intense du Myleran.

L'autoradiographie nous montre aussi que le Myleran réagit avec certaines régions chromosomiques et non avec d'autres.

Bien que les endroits où les lésions se produisent ne se montrent que rarement marqués, il y a de fortes chances pour que le Myleran ait réagi avec des régions hétérochromatiques topographiées avec certitude. Cependant, cette réaction est loin d'être exclusive. D'autres régions chromosomiques où l'hétérochromasie ne peut être démontrée peuvent réagir. On est tenté de déduire que si la majeure partie des aberrations de structure ont une relation avec l'hétérochromatine, il n'en sera pas de même pour les mutations géniques.

Ceci n'exclut pas la possibilité d'une réaction préférentielle du Myleran à l'échelle moléculaire.

G. M. TIMMIS (1960) suggère une réaction d'alkylation possible avec les deux bases puriques (adénine et guanine) et pyrimidique (cytosine) mais considérablement plus aisée avec la guanine avec formation d'une 7-Alkyl-guanine.

Si cette spécificité de réaction s'avérait exacte, elle offrirait de grandes possibilités futures non seulement dans le domaine de la mutagenèse dirigée mais encore dans l'analyse de la fine structure génique.

Un marquage plus intense en prophase se rencontre non seulement chez *Vicia* mais a été retrouvé dans d'autres organismes (J. et M. MOUTSCHEN-DAHMEN, 1962).

On peut penser que, dans les expériences avec graines prégermées, le maximum de réactivité avec les chromosomes peut être atteint à un moment proche de la prophase. Par contre, dans les expériences sans prégermination, il aurait presque entièrement réagi avant la période de reproduction des chromosomes. Cette hypothèse est, d'autre part, étayée par de nombreux faits cytologiques.

Le fait que le nombre de grains soit inférieur au cours des phases succédant la prophase peut s'expliquer de la manière suivante :

après d'une molécule, la partie tritiée pourrait se détacher sous forme d'un corps extrait par le procédé technique utilisé.

Une grande réserve s'impose donc quant aux régions chromosomiques au-dessus desquelles aucun grain ne peut être détecté.

Une autre possibilité serait que le Myleran réagisse avec des constituants prophasiques migrant dans le cytoplasme en fin de prophase par exemple de l'ARN ou des ARN-protéines. Le fait qu'en métaphase, le nombre de grains comptés au-dessus du cytoplasme est significativement supérieur au nombre de grains comptés au-dessus du cytoplasme en prophase rend cette dernière hypothèse plausible.

On sait, d'autre part, que le Myleran marque les nucléoles (J. et M. MOUTSCHEN-DAHMEN, *loc. cit.*).

CONCLUSIONS

1) Chez *Vicia faba*, il existe une différence notable dans le marquage des méristèmes radiculaires par le Myleran tritié suivant que l'on traite des graines avec ou sans prégermination.

2) Il existe une relation entre les résultats autoradiographiques, la courbe d'absorption de la substance et l'intensité des lésions chromosomiques.

3) La comparaison de ces données révèle cependant l'existence d'une période de sensibilité accrue au toxique.

4) Au cours de toutes les expériences, le cytoplasme et le noyau ont été marqués à des degrés divers.

5) Pendant le cycle mitotique, les cellules en prophase sont davantage marquées et nous avons suggéré une explication de ce fait.

6) Il existe au-dessus de certaines régions nucléaires et chromosomiques des accumulations de grains. Aucune relation avec l'endroit des lésions n'a néanmoins pu, jusqu'à présent, être établie.

7) Certaines régions hétérochromatiques peuvent s'avérer marquées mais il est certain que le Myleran peut aussi réagir avec d'autres parties des chromosomes.

Résumé

Des cellules de méristèmes radiculaires de *Vicia faba* ont été marquées au Myleran tritié.

Les nombres de grains d'argent comptés au-dessus des cellules sont plus élevés lorsque les graines sont prégermées avant traitement par le Myleran. Dans toutes les expériences, le cytoplasme et les noyaux étaient marqués. Une relation entre la courbe d'absorption de la substance et le taux d'aber-

rations chromosomiques a pu être établie. Au cours du cycle mitotique, la prophase montre un marquage plus intense que d'autres phases du cycle et que les noyaux quiescents.

Une explication de ce fait est suggérée.

On note des accumulations de grains d'argent au-dessus de certaines régions nucléaires et chromosomiques.

Bien que certaines de ces régions soient hétérochromatiques, il n'est pas douteux que d'autres régions chromosomiques puissent absorber la substance tritiée.

Riassunto

Sono state marcate con Myleran tritié alcune cellule dei meristemi radicali di *Vicia faba*.

Il numero dei grani d'argento contati al di sopra delle cellule è più elevato allorché i grani sono germogliati prima del trattamento col Myleran.

In tutte le esperienze tanto il citoplasma che i nuclei erano marcati.

Si è potuto stabilire una relazione tra la curva di assorbimento della sostanza e il tasso di aberrazioni cromosomiche. Nel corso del ciclo mitotico si ha un marcamento più intenso nella profase anziché nelle altre fasi del ciclo e durante la quiescenza dei nuclei.

E' proposta una spiegazione di questo fatto.

Si nota altresì un accumulo di grani d'argento al di sopra di alcune regioni nucleari e cromosomiche.

Sebbene alcune di queste regioni siano eterocromatiche, non vi è dubbio che altre regioni cromosomiche siano in grado di assorbire la sostanza in questione.

Resumen

Han sido marcadas con Myleran tritié algunas células de los meristemos radiculares de *Vicia faba*.

El número de granos de plata contados sobre las células es mas elevado cuando los granos han germinado antes del tratamiento con Myleran.

En todas las experiencias tanto el citoplasma como los nucleos estaban marcados.

Se ha podido establecer una relación entre la curva de absorción de la substancia y la tasa de aberraciones cromosomicas. En el curso del ciclo mitotico se tiene un marcamiento mas intenso en la profase que en las otras fases y durante el reposo nuclear.

Se propone una explicación de este hecho.

Se nota además un acúmulo de granos de plata sobre algunas regiones nucleares y cromosomicas.

Si bien algunas de estas regiones son heterocromáticas, no se duda de que otras regiones cromosomicas estén en situación de adsorber la substancia en cuestion.

Summary

Root tips cells of *Vicia faba* have been labelled with tritiated Myleran.

Grains number over cells were found to be much higher when seeds were presoaked before the treatment. In all experiments, both cytoplasm and nucleus were labelled.

Relations with the absorption curve and the amount of chromosome da-

mage could be established. During the mitotic cycle, prophase showed a higher labelling than other mitotic phases and resting nuclei. An explanation of this fact is suggested. Grains accumulations were found to occur over some nuclear and chromosomal parts some of which are heterochromatic. However, it is obvious that other chromosomal parts can also take up the tritiated compound.

Zusammenfassung

Einige Zellen der Würzelmeristeme von *Vicia faba* wurden mit Myleran trititi gekennzeichnet.

Die Zahl der Silberkörner, die oberhalb der Zellen gezählt werden konnten, steigt an, wenn die Körner gekeimt haben vor der Behandlung mit Myleran.

In allen Versuchen, waren sowohl das Cytoplasma als auch die Kerne gekennzeichnet.

Es konnte ein Verhältnis zwischen der Adsorptionskurve der Substanz und der Zahl der Chromosomabweichungen festgestellt werden. Während des Mitosenzyklus, erscheint die Prophase am deutlichsten markiert im Vergleich zu den anderen Phasen des Zyklus, dasselbe ereignet sich während des Ruhezustands der Kerne.

Es wird eine mögliche Erklärung dieser Tatsache vorgeschlagen. Man beobachtete weiterhin eine Ansammlung von Silberkörnern oberhalb einiger Kern- und Chromosomenstellen.

Obschon einige dieser Gegenden haeterochromatischer Natur sind, sind zweifelsohne andere Chromosomgegenden imstande die in Frage kommende Substanz zu absorbieren.

Bibliografia

- McLEISH J.: *The action of maleic hydrazide in Vicia*. Hereditas, 6 (suppl.), 125-147, 1953.
- MOUTSCHEN-DAHMEN J. et M.: *Action du Myleran (di-méthane Sufonyloxybutane) sur les chromosomes chez Hordeum sativum et chez Vicia faba*. Hereditas, 44, 415-446, 1958.
- MOUTSCHEN-DAHMEN J. et M., VERLY W. G. et KOCH G.: *Autoradiograms with tritiated Myleran*. Exp. Cell. Res., 20, 585-588, 1960.
- MOUTSCHEN-DAHMEN M. et J.: *Intracellular localization of tritiated Myleran in plant and animal cells*. Journ. of physical and biochemical Cytology, 1962 (in press).
- PELC S. R.: *Metabolic activity of D.N.A. as shown by autoradiographs*. Laboratory Investigation, 8, 1, 225-236, 1959.
- STACEY K. A.: *The reaction of the «radio-mimetic» alkylating agents with macromolecules in vitro*. Ann. N. Y. Acad. of Sc., 68, 3, 682-701, 1958.
- TIMMIS G. M.: *The action of antimetabolites and biological alkylating agents on the synthesis of D.N.A. and a possible relation between the mechanisms of action*. Coll. and Metab. and Synth. of D.N.A., Liège, 49-56, 1960.
- VERLY W. G., DEWANDRE A., DULCINO J. et MOUTSCHEN-DAHMEN J. et M.: *Réaction in vivo du diméthanesulfonate de butanediol - 1,4 (Myleran) avec l'acide désoxyribonucléotique des graines de Vicia faba*. Arch. Intern. Physiol. et Bloch., 68, 4, 707-708, 1960.
- VERLY W. G., DEWANDRE A. et MOUTSCHEN-DAHMEN J. et M.: *Réaction du Myleran avec la désoxyribonucléoprotéine des graines de Vicia faba en germination*. Arch. Intern. Physiol. et Bloch., 68, 5, 847-849, 1960.