

Le chromosome métaphasique : Étude morphologique et biochimique

M. DEMINATTI, X. DESBIENS, J.L. LAI et N. JACQUELOOT.

Des chromosomes métaphasiques de cellules KB ont été isolés selon la technique de SALZMAN et MENDELSON. Des préparations en microscopie électronique de chromosomes in situ, après isolement et après purification montrent que l'intégrité de ce matériel a été préservée au cours de l'isolement.

Les dosages biochimiques effectués sur ces chromosomes ont mis en valeur la prépondérance des protéines dans ces organites cellulaires.

Le chromosome métaphasique est un organite cellulaire dont la morphologie et la composition biochimique intimes ont fait l'objet de nombreuses investigations. Pourtant, nos connaissances sur la structure chromosomique se résument à quelques hypothèses bien incomplètes. Le plus souvent, les données ultrastructurales, biophysiques et biochimiques ne présentent pas la complémentarité souhaitée. Plus importante encore est la discordance entre la structure hypothétique et la « physiologie » du chromosome.

Les schémas proposés doivent en effet être en accord avec les propriétés fondamentales du chromosome :

— Pérennité de sa structure à travers les étapes des cycles mitotique ou méiotique : disparition lors de l'interphase, morphologies variées lors de la méiose...

— Constance dans la position des gènes le long du chromosome.

— Formation de deux chromatides identiques avec répllication de l'ADN permettant les divisions cellulaires.

— Variations de son activité métabolique au cours des cycles cellulaires.

— Possibilités d'accidents structuraux : translocations, délétions, formations annulaires...

— Mobilité lors de la mitose, comportement particulier lors de la méiose : leurs anomalies.

* Travail réalisé avec les crédits du contrat de recherche de l'U.E.R. III.

Pour aborder les problèmes de la structure chromosomique, il faut disposer en quantité suffisante de matériel purifié. Cette nécessité justifie l'emploi de l'isolement de chromosomes métaphasiques que nous avons réalisé sur des cellules KB. Des études morphologiques et biochimiques ont été menées à partir de ces stocks chromosomiques.

I. — DONNEES ULTRASTRUCTURALES ET BIOCHIMIQUES

Les images en coupe ultrafine n'ont fait que révéler la constitution fibrillaire du chromosome qu'il soit mitotique ou méiotique. (RIS, 48-50 ; GRASSE et AL, 24 ; KAUFMANN et Mc DONALD, 31 ; KAUFMANN et AL, 32 ; WOLFE et GRIM, 62 ; ZIRKIN et WOLFE, 66 ; SOLARI, 56). Il a fallu attendre que GALL (21) adapte la technique de KLEINSCHMIDT (33) pour visualiser la chromatine interphasique puis le chromosome dans leur ensemble. Cette technique précocise la rupture des membranes cellulaires au contact d'une surface liquidienne. La chromatine ou les chromosomes ainsi libérés sont recueillis directement sur une grille, déshydratés par la technique du point critique d'ANDERSON (2) et observés « in toto ».

Tous les auteurs (GALL, 21 ; DUPRAW, 16 ; WOLFE, 61 ; WOLFE et GRIM, 62 ; BARNICOT, 4 ; WOLFE et MARTIN, 63 ; ABUELO et MOORE, 1 ; DUPRAW et BAHR, 18 ; BAHR, 3 ; LAMPERT, 34-35 ; MOURICAND et Col. 44) décrivent les mêmes fibres d'environ 250 Å, soit arrangées en filet pour la chromatine,

soit pelotonnées en écheveaux très serrés pour les chromosomes. Dans ce dernier cas, des fibres connectent les chromatides sœurs, d'autres semblent sortir du chromosome, celui-ci paraît emprisonné dans un réseau de fibres interchromosomiques reliées aux pores de l'enveloppe nucléaire (COMINGS et OKADA, 12 ; LAMPERT, 36). Cet aspect désorganisé a été confirmé depuis par la technique de microscopie à balayage : GOLOMB et BAHR (23), suivent l'évolution de la fibre chromosomique de l'interphase à la métaphase. TANAKA (58) constate que cette fibre est capable de s'enrouler plusieurs fois sur elle-même augmentant ainsi son diamètre, (fig. 1) et confirme les observations de BASTIA (5).

PLANCHE I

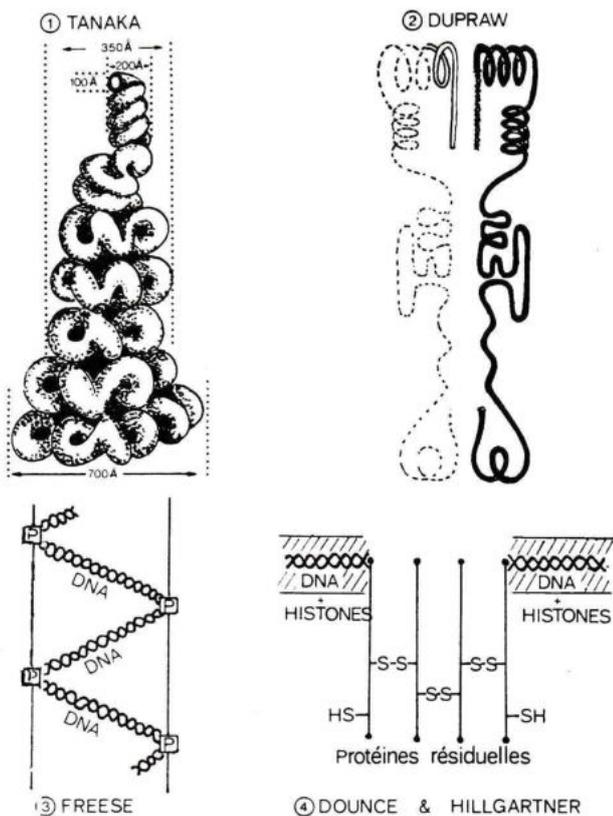


Fig. 1. — Enroulement de l'unité fibrillaire selon TANAKA.
 Fig. 2. — Modèle chromosomique de DUPRAW.
 Fig. 3. — Unité structurale chromosomique de FREESE.
 Fig. 4. — Unité structurale chromosomique de DOUNCE et HILLGARTNER.

La fibre de 250 Å considérée comme unité chromosomique a fait l'objet d'études plus approfondies : elle semble formée d'une gaine protéique très sensi-

ble aux agents tels que la pronase ou la trypsine qui font décroître son diamètre jusqu'à 30 Å. Ce « cœur » non protéique est fragmenté par la DNase (RIS, 51). Quant à l'organisation spatiale de la fibre, on a montré que l'action d'agents protéolytiques la détruisait (GEORGIEV, 22). Le DNA serait donc le support immuable de l'unité fibrillaire chromosomique alors que les protéines habilleraient cette molécule axiale en lui conférant une organisation spatiale susceptible de se remodeler au cours du cycle cellulaire.

Pour DUPRAW (17), le chromosome ne contient qu'une chaîne de DNA par chromatide, l'unité chromosomique est une simple fibre nucléoprotéique qui correspond à une hélice de WATSON et CRICK. Cette hélice de DNA est enrobée dans des polypeptides et s'enroule sur elle-même plusieurs fois pour former une fibre de 250 Å. L'enroulement est dû et maintenu par des ponts entre histones riches en arginine (protéines basiques). A la période S du cycle mitotique, l'unité chromatidienne se réplique au niveau de fourches de réplication. Après la réplication, les fibres filles restent liées par des portions non répliquées au niveau du centromère. La réplication s'y produit juste avant l'anaphase. Les fibres s'enroulent de manière reproductible d'une génération cellulaire à l'autre, mais pas en ordre clairement reconnaissable. Les chromatides ne sont pas nécessairement linéaires et le bout des chromosomes ne correspond pas forcément au bout de la molécule.

De nombreuses études faites sur la fibre chromosomique interphasique confirment l'importance des histones dans la structure de cette fibre (SMART et BONNER, 55 ; PAUL, 46 ; FAMBROUGH et BONNER, 19 ; CHALKLEY et JENSEN, 10). Mais le modèle proposé par DUPRAW n'est pas en accord avec la chronologie de la réplication au niveau du centromère. D'autre part nous ignorons totalement la longueur d'une molécule de DNA chez les organismes supérieurs. Les autoradiogrammes d'HUBERMAN et RIGGS (28) ne dépassent pas 1,6 à 1,8 mm alors qu'ils estiment à 9 cm la longueur théorique d'une molécule de DNA pour un chromosome de taille moyenne chez le Hamster. Il n'est donc pas impossible que l'unité fibrillaire chromosomique soit en fait une succession linéaire de plusieurs chaînes de DNA (FREESE, 20) (fig. 3) ou une juxtaposition latérale d'un nombre variable de ces chaînes (HUSKINS, 30 ; NEBEL, 45 ; RIS, 49 ; KAUFMANN et Al., 32 ; LUZZATI et NICOLAIEFF, 38). DOUNCE et HILLGARTNER (15) ont isolé des protéines résiduelles non histoniques que le thioglycollate de Na scinde en deux groupes par destruction des ponts disulfures ; or, ces protéines sont intimement liées aux extrémités des molécules de DNA. La création de ponts disulfures entre deux protéines résiduelles assure la soudure de deux extrémités moléculaires de DNA (fig. 4). Ceci peut expli-

quer l'existence de séquences de DNA répétitif composées de DNA « masters » régissant une succession de DNA « slaves » ou copies. (CALLAN, 8 ; WHITEHOUSE, 60 ; HENDERSON, 26).

II. — L'ISOLEMENT DES CHROMOSOMES METAPHASIQUES

Les auteurs ont réalisé cet isolement à partir de matériels divers : cellules de Hamster (CHALKLEY et JENSEN, 10 ; MAIO et SCHILDKRAUT, 40-41 ; MENDELSON, MOORE et SALZMAN, 42 ; SALZMAN et MENDELSON, 53 ; SOMERS, COLE et HSU, 57 ; WRAY et STUBBLEFIELD, 64 ; WRAY, STUBBLEFIELD et HUMPHREY, 65), cellules Hela (BURKHOLDER et MUKHERJEE, 6 ; HUBERMAN et ATTARDI, 27-29 ; MAIO et SCHILDKRAUT, 40 ; SALZMAN, MOORE et MENDELSON, 52 ; SALZMAN et MENDELSON, 53), cellules tumorales de Souris (CANTOR et HEARST, 9 ; CHORAZY, BENDICH, BORENFREUND et HUTCHISON, 11), lymphocytes humains (SMART et BONNER, 55).

Différents pH ont été utilisés : pH acide (CANTOR et HEARST, 9 ; HUBERMAN et ATTARDI, 27 ; SALZMAN, MOORE et MENDELSON, 52 ; SCHNEIDER et SALZMAN, 54 ; SOMERS, COLE et HSU, 57), pH neutre (CHORAZY, BENDICH, BORENFREUND et HUTCHISON, 11 ; MAIO et SCHILDKRAUT, 40 ; WRAY et STUBBLEFIELD, 64), pH basique (COORY et COLE, 14 ; WRAY et STUBBLEFIELD, 64).

Nous avons retenu et adapté la technique de SALZMAN et MENDELSON en pH acide (53). Nous utilisons des cultures de cellules KB (Souche KB 3 Green) en suspension dans un milieu « MEM JOKLIK Modified (GIBCO) » additionné de 5 % de sérum de cheval. A raison de 200.000 cellules par ml, la population cellulaire double en 24 heures.

Les cellules en mitose sont bloquées au stade de la métaphase par addition de colchicine (Colchicinés HOUDE) pendant environ 15 heures. Chaque litre de suspension cellulaire contient alors 2×10^8 cellules. Elles sont recueillies sous forme de culot de centrifugation et subissent plusieurs lavages dans le milieu de culture dépourvu de sérum. Ces lavages sont suivis d'un choc hypotonique de SALZMAN et MENDELSON à 37° C. Les cellules turgescentes récupérées par centrifugation à 850 tours par minute pendant 5 minutes, sont broyées dans un homogénéiseur de DOUNCE. Le milieu d'homogénéisation contient alors un mélange de chromosomes, de noyaux interphasiques et de débris cytoplasmiques et membranaires. Une centrifugation à 1.000 tours par minute (10 minutes) permet la sédimentation presque totale des noyaux. Le surnageant subit une centrifugation à

2.500 tours par minute pendant 1 heure 30 minutes. Le culot obtenu qui contient les chromosomes et les contaminants cytoplasmiques et membranaires, est remis en suspension et lavé dans la solution tampon à pH 3 de SALZMAN et MENDELSON. Une dernière centrifugation à 50.000 g pendant 1 heure (SPINCO rotor SW 27) permet la sédimentation des chromosomes à travers une solution de sucrose 2,2 M dans le tampon de pH 3, tandis que les contaminants cytoplasmiques et membranaires sont relargués en surface. Les chromosomes purifiés sont conservés dans la solution tampon de pH 3 à 4° C.

III. — ETUDE DES CHROMOSOMES ISOLES A PH ACIDE

1) Etude ultrastructurale

Des contrôles en microscopie électronique nous conduisent à admettre que la majorité des chromosomes métaphasiques reste intacte au cours de l'isolement.

Nous utilisons 3 à 5 gouttes de matériel en suspension, soit dans le milieu hypotonique pour les cellules entières, soit dans le milieu d'homogénéisation pour les chromosomes débarrassés des noyaux, soit dans la solution tampon de pH 3 pour les chromosomes purifiés. Ces gouttes sont déposées sur des grilles recouvertes de membranes de formvar et déshydratées dans des bains d'alcool éthylique de degré croissant puis dans un bain d'acétate d'amyle. Elles sont séchées à l'air avant d'être observées au microscope électronique (ZEISS EM 9). Nous n'utilisons pas le dispositif d'ANDERSON (2) pour parfaire la déshydratation. Les observations et photographies ont été réalisées sans coloration préalable des grilles.

a) Examen de cellules entières dans le milieu hypotonique.

A ce stade de l'isolement, les cellules métaphasiques restent mélangées aux cellules interphasiques, on retrouve donc des noyaux sous l'aspect de masses arrondies et uniformément opaques aux électrons. Les cellules en division perdent cette opacité et on y distingue des structures comparables à celles observées en microscopie optique.

Les deux chromatides des chromosomes *in situ* sont constituées d'un réseau fibrillaire très dense. Dans certains cas, elles sont étirées et montrent des portions denses arrondies reliées entre elles par des ponts fibrillaires plus étroits (fig. 5 et 6). Quand l'étirement affecte les deux chromatides du même chromosome on note une similitude de la répartition de ces « bandes » rappelant celles observées en microscopie optique après action d'agents divers (bandes Q, C, R et G) (fig. 3).

Les fibres chromosomiques périphériques ne montrent pas d'organisation précise. Leur diamètre est compris entre 180 et 230 Å. Mais il existe des portions plus minces et d'autres plus épaisses. Elles se chevauchent et il est difficile de définir une direction préférentielle pour ces fibres. Cependant certaines d'entre elles connectent transversalement les deux chromatides d'un bras chromosomiques formant un **réseau fibrillaire interchromatidien** (fig. 6). De même, au niveau du centromère transitent des fibres inter et intrachromatidiennes (structure quadripartite décrite par ABUELO et MOORE, 1 ; COMINGS et OKADA, 13).

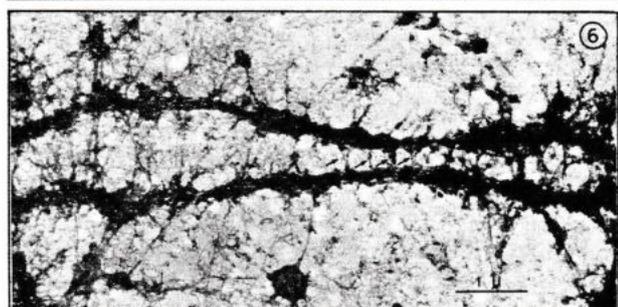
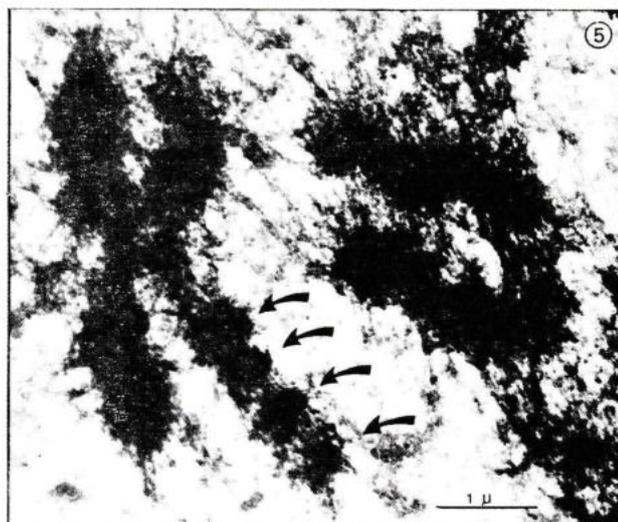


Fig. 5. — Chromosomes métaphasiques « in situ ».

Fig. 6. — Chromosome métaphasique « in situ » : présence de fibres interchromatidiennes.

Fig. 7. — Chromosome métaphasique « in situ » : épaississements identiques sur les deux chromatides.

Qu'ils soient étirés ou contractés, les chromosomes sont noyés dans un système complexe de fibres en continuité avec le réseau périphérique de chaque chromatide (fig. 5, 6, 7). En certains endroits ce **réseau fibrillaire interchromosomique** semble se pelotonner en structures globuleuses, de forte densité aux électrons (fig. 8, flèche a). Ailleurs, c'est en structure annulaire d'environ 1.000 Å de diamètre extérieur que nous le retrouvons (fig. 8, flèche b) (pores nucléaires de COMINGS et OKADA, 12 ; de LAMPERT, 36).

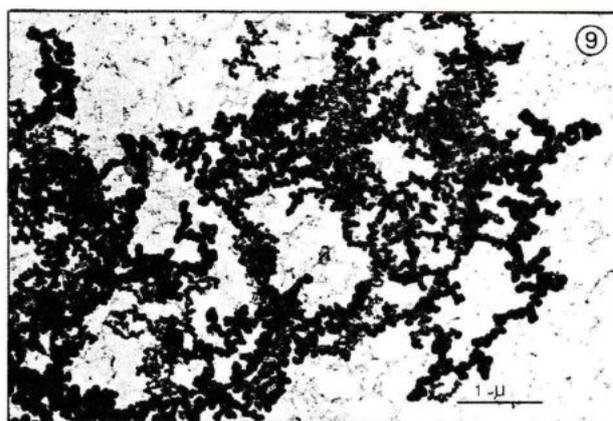
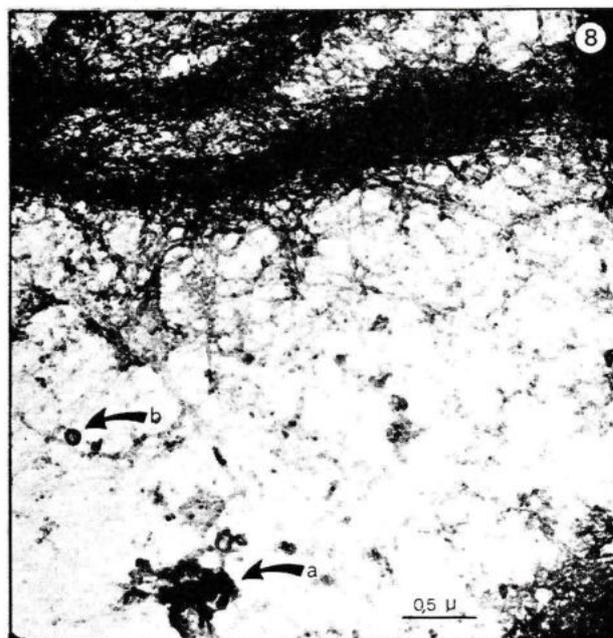


Fig. 8. — Réseau interchromosomique :

— Flèche a : structure globuleuse.

— Flèche b : structure annulaire.

Fig. 9. — Réseau de fibres enroulées plusieurs fois sur elles-mêmes.

Nous avons aussi rencontré de rares formations ayant l'aspect d'un réseau isolé de grosses fibres semblant constituées de sphérules plus ou moins fusionnées et dont le diamètre varie du simple au double selon la portion du réseau considérée (jusqu'à 750 Å). Dans ce réseau, coexistent les fibres minces analogues à celles observées à la périphérie des chromosomes (fig. 9). Les grosses fibres s'en différencient par deux aspects : leur diamètre accru et le fait que l'on n'y trouve aucune portion rectiligne.

b) Observation de chromosomes après élimination des noyaux.

La partie axiale des chromatides est homogène et uniformément contrastée. Les fibres périphériques

apparaissent plus serrées à proximité de l'axe chromatidien. Le centromère n'apparaît plus que sous la forme d'une constriction. Le **réseau interchromosomique** observé sur cellules entières ne subsiste qu'en lambeaux dispersés sur les grilles. Nous avons retrouvé les grosses fibres signalées antérieurement.

c) Examen de chromosomes purifiés.

Dans ces préparations, les chromosomes sont isolés ou regroupés et présentent un réseau fibrillaire ayant les mêmes caractéristiques que celui décrit dans le paragraphe précédent : ils sont contractés et on retrouve une zone axiale très compacte, ainsi qu'une zone périphérique formée de fibres enchevêtrées (fig. 10).



Fig. 10. — Chromosome métaphasique isolé et purifié : disparition du réseau interchromosomique.

Par contre, le **réseau fibrillaire interchromosomique** observé dans les préparations précédentes a disparu. Toutefois, des fibres forment des faisceaux rectilignes entre les chromosomes regroupés : ces faisceaux sont constitués de fibres qui ont été préservées au cours de l'isolement ou de « ponts » néoformés en fin de manipulation. La disparition quasi totale du **réseau interchromosomique** permet d'examiner plus en détail la région périphérique des chromosomes. Certaines fibres marginales (180 à 230 Å) forment des boucles pour revenir vers la zone axiale du bras chromosomique, d'autres longent l'axe chromatidien, d'autres enfin semblent se diviser en deux branches distinctes. Entre les chromatides d'un même chromosome persistent les fibres interchromatidiennes.

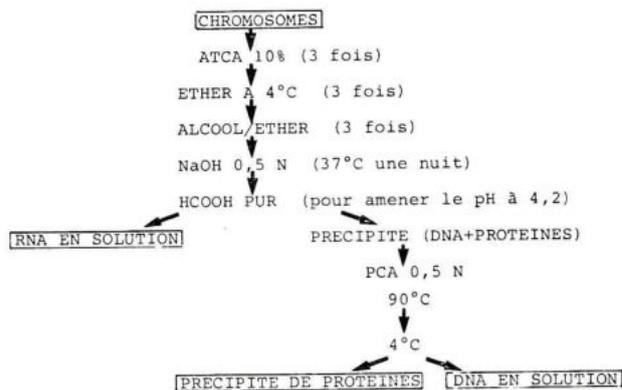
D'autre part, la purification n'élimine pas des préparations les grosses fibres que nous retrouvons soit isolées soit en continuité avec des chromosomes.

En conclusion, si le chromosome résiste aux manipulations de l'isolement (son aspect a été retrouvé après trois mois de conservation dans la solution tampon de pH 3), le **réseau interchromosomique** observé dans les cellules entières, qui se fragmente lors de l'homogénéisation, est éliminé par la purification.

2) Analyses biochimiques.

Disposant en quantité suffisante de chromosomes métaphasiques ayant conservé leur intégrité morphologique, nous avons pu procéder à l'analyse de leur

Tableau 1
Extraction du DNA, du RNA, des protéines à partir de chromosomes métaphasiques de cellules KB



composition globale en dosant le DNA, le RNA et les protéines. Chacune de ces fractions a été extraite selon le protocole décrit dans le tableau 1, et dosée par la technique de BURTON (7) pour le DNA, de LOWRY (37) pour les protéines et par la technique à l'orcinol de TILLMANS et PHILIPPI (59) modifiée par RIMINGTON (47) pour le RNA. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 2. On pourra comparer dans ce même tableau les résultats relatifs aux différentes techniques et matériels utilisés par les auteurs et publiés par HEARST et BOTCHAN (25). Le DNA constitue entre 13 et 21 % du chromosome, le RNA entre 8 et 16 % et les protéines entre 66 et 76 %.

Tableau 2 Analyse biochimique de chromosomes métaphasiques

Préparation	DNA	RNA	Protéines
CANTOR et HEARST Ascites de souris	13,5	13,5	68
HUBERMAN et ATTARDI Cellules Hela	15,7	10,4	73,9
MAIO et SCHILDKRAUT Cellules Hela	16,4	11,6	72
Cellules de Hamster Chinois	15,7	15,3	69
Cellules de Hamster Syrien	16,7	15	68,3
Cellules L	17	13,4	69,6
SADGOPAL Cellules Hela ; isolement d'après HUBERMAN et ATTARDI, d'après MAIO et SCHILDKRAUT	15,6 16,2	8,7 10,9	75,7 72,9
SALZMAN, MOORE et MENDELSON Cellules Hela	20	14	66
RESULTATS PERSONNELS Cellules KB	21	10	69

IV. — CONCLUSION

De l'étude comparative en microscopie électronique de chromosomes *in situ* et de chromosomes isolés, nous pouvons affirmer que l'emploi des agents mécaniques et physicochimiques de l'isolement à pH acide n'a pas affecté le chromosome métaphasique

de cellule KB. Par ailleurs, l'analyse biochimique indique la richesse de cet organite cellulaire en protéines.

Nous remercions les Professeurs J. SAMAILLE et G. BISERTE ainsi que M. C. LAGROU et Madame F. PUVION pour leur aide et leur conseils.

Laboratoire de Génétique (Professeur M. DEMINATTI)

BIBLIOGRAPHIE

- 1) ABUELO J.G., MOORE D.E. — *J. Cell. Biol.*, 1969, **41**, 73.
- 2) ANDERSON T.F. — *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 1951, **13**, 130.
- 3) BAHR G.F. — *Exp. Cell. Res.*, 1970, **62**, 39.
- 4) BARNICOT N.A. — *J. Cell. Biol.*, 1967, **32**, 585.
- 5) BASTIA D., SWAMINATHAN M.S. — *Exp. Cell. Res.*, 1967, **48**, 18.
- 6) BURKHOLDER G.D., MUKHERJEE B.B. — *Exp. Cell. Res.*, 1970, **61**, 413.
- 7) BURTON K. — *Biochem. J.*, 1956, **62**, 315.
- 8) CALLAN H.G. — *J. Cell. Sci.*, 1967, **2**, 1.
- 9) CANTOR K.P., HEARST J.E. — *Proc. N.A.S.*, 1966, **55**, 642.
- 10) CHALKLEY G.R., JENSEN R.H. — *Biochemistry*, 1968, **7**, 4380.
- 11) CHORAZY M., BENDICH A., BORENFREUND E., HUTCHISON D.J. — *J. Cell. Biol.*, 1963, **19**, 59.
- 12) COMINGS D.E., OKADA T.A. — *Exp. Cell. Res.*, 1970, **63**, 62.
- 13) COMINGS D.E., OKADA T.A. — *Cytogenetics*, 1970, **9**, 436.
- 14) COORY P.M., COLE A. — *Radiation Res.*, 1968, **36**, 528.
- 15) DOUNCE A.L., HILLGARTNER C.A. — *Exp. Cell. Res.*, 1964, **36**, 228.
- 16) DUPRAW E.J. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1965, **53**, 161.
- 17) DUPRAW E.J. — *Nature*, 1965, **206**, 338.
- 18) DUPRAW E.J., BAHR G.F. — *Acta Cytol.*, 1969, **13**, 188.
- 19) FAMBROUGH D.M., BONNER J. — *J. Biol. Chem.*, 1968, **243**, 4434.
- 20) FREESE E. — *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1958, **23**, 13.
- 21) GALL J.G. — *Science*, 1963, **139**, 120.
- 22) GEORGIEV G.P., ILYIN Y.V., TIKHONENKO A.S., STELMASHCHUK V.Y. — *Mol. Biologia*, 1970, **4**, 246.
- 23) GOLOMB H.M., BAHR G.F. — *Exp. Cell. Res.*, 1974, **84**, 79.
- 24) GRASSE P.P., CARASSO N., FAVARD P. — *Ann. Sci. Nat. Zool. et Biol. Animale*, 1956, **18**, 339.
- 25) HEARST J.E., BOTCHAN M. — *Ann. Rev. Biochemistry*, 1970, **39**, 151.
- 26) HENDERSON S.A. — *Chromosoma*, 1971, **35**, 28.
- 27) HUBERMAN J.A., ATTARDI G. — *J. Cell. Biol.*, 1966, **31**, 95.
- 28) HUBERMAN J.A., RIGGS A.D. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, (Wash), 1966, **55**, 599.
- 29) HUBERMAN J.A., ATTARDI G. — *J. Mol. Biol.*, 1967, **29**, 487.
- 30) HUSKINS G.L. — *Cytologia Fujii Jub. Vol.*, 1937, Pt II, 1015.
- 31) KAUFMANN B.P., Mc DONALD M.R. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1956, **21**, 233.
- 32) KAUFMANN B.P., GAY H., Mc DONALD M.R. — *Intern. Rev. Cytol.*, 1960, **9**, 77.
- 33) KLEINSCHMIDT A.K., LANG D., JACHERTS D., ZAHN R.K. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **61**, 857.
- 34) LAMPERT F., LAMPERT P. — *Humangenetik*, 1970, **11**, 9.
- 35) LAMPERT F. — *Nature*, 1971, **234**, 187.
- 36) LAMPERT F. — *Humangenetik*, 1971, **13**, 285.
- 37) LOWRY O.H., ROSENBOUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.

- 38) LUZZATI V., NIKOLAIEFF A. — *J. Mol. Biol.*, 1959, **1**, 127.
- 39) Mc LIMANS W.F., DAVIS E.V., GLOVER F.L., RAKE G.W. — *J. Immunol.*, 1957, **79**, 428.
- 40) MAIO J.J., SCHILDKRAUT C.L. — *J. Mol. Biol.*, 1967, **24**, 29.
- 41) MAIO J.J., SCHILDKRAUT C.L. — *J. Mol. Biol.*, 1969, **40**, 203.
- 42) MENDELSON J., MOORE D.E., SALZMAN N.P. — *J. Mol. Biol.*, 1968, **32**, 101.
- 43) MIRSKY A.E., RIS H. — *J. Gen. Physiol.*, 1947, **31**, 1.
- 44) MOURIQUAND C., GILLY C., WOLFF C. — *Ann. Génét.*, 1972, **15**, 249.
- 45) NEBEL B.R. — *Bot. Rev.*, 1939, **5**, 563.
- 46) PAUL J., MORE I.R. — *Nature New Biol.* 1972, **239**, 134.
- 47) RIMINGTON C. — *Biochem. J.*, 1940, **34**, 931.
- 48) RIS H. — In « Symposium on fine structure of cells ; Held at 8 th Congress of cell biology, Leiden, Holland, 1954 », 1955, p. 121. Inter-science, New-York.
- 49) RIS H. — In « The Chemical Basis of Heredity » (W.D. Mc ELROY and GLASS, eds) 1957, p. 23, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland.
- 50) RIS H. — *Can. J. Genet. Cytol.*, 1961, **3**, 95.
- 51) RIS H. — *Handbook of Molecular Cytology* (Lima de Faria), 1969, **15**, 221.
- 52) SALZMAN N.P., MOORE D.E., MENDELSON J. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1966, **56**, 1447.
- 53) SALZMAN N.P., MENDELSON J. — *Meth. Cell. Physiol.*, 1968, **3**, 277.
- 54) SCHNEIDER E.L., SALZMAN N.P. — *Science*, 1970, **167**, 1141.
- 55) SMART J.E., BONNER J. — *J. Mol. Biol.*, 1971, **58**, 675.
- 56) SOLARI A.J. — *Exp. Cell. Res.*, 1968, **53**, 553.
- 57) SOMERS C., COLE A., HSU T.C. — *Exp. Cell. Res.*, Suppt. 9, 1963, 220.
- 58) TANAKA K., IINO A. — *Exp. Cell. Res.*, 1973, **81**, 40.
- 59) TILLMANS J., PHILIPPI K. — *Biochem. Z.*, 1929, **215**, 36.
- 60) WHITEHOUSE H.L.K. — *J. Cell. Sci.*, 1967, **2**, 9.
- 61) WOLFE S.L. — *J. Ultrastruct. Res.*, 1965, **12**, 104.
- 62) WOLFE S.L., GRIM J.N. — *J. Ultrastruct. Res.*, 1967, **19**, 382.
- 63) WOLFE S.L., MARTIN P.G. — *Exp. Cell. Res.*, 1968, **50**, 140.
- 64) WRAY W., STUBBLEFIELD E. — *Exp. Cell. Res.*, 1970, **59**, 469.
- 65) WRAY W., STUBBLEFIELD E., HUMPHREY R. — *Nature New Biology*, 1972, **238**, 237.
- 66) ZIRKIN B.R., WOLFE S.L. — *J. Ultrastruct. Res.*, 1972, **39**, 496.