

Les effets d'un choc thermique sur la morphogénèse des œufs de Batraciens

Les effets de températures «supramaximales» sur le développement des œufs de Batraciens ont été étudiés par LATINIK¹ et par HOADLEY²; celui-ci a cultivé les œufs de façon prolongée à 30,2, tandis que LATINIK a recherché le temps nécessaire, aux différents stades, pour obtenir un pourcentage élevé d'anomalies. Dans les deux cas, il a été constaté que la résistance des œufs à la chaleur s'accroît à mesure que leur développement progresse. Les anomalies obtenues par HOADLEY sont fort intéressantes, parce qu'elles portent surtout sur l'organisateur (absence de la chorde, microcéphalie). LEHMANN³ a émis récemment l'hypothèse que le chauffage à hautes températures atteindrait plus particulièrement les «plastés», c'est-à-dire les granules ribonucléoprotéiques auxquels nous avons attribué précédemment un rôle important dans la morphogénèse⁴ et dont CLAUDE⁵ a établi la thermolabilité.

Cette hypothèse de LEHMANN a acquis un intérêt nouveau à la suite des belles recherches de SONNEBORN⁶ établissant qu'il est possible d'inactiver par un choc thermique le facteur κ des Paramécies; ce facteur serait, selon SONNEBORN, un plasmagène de nature nucléoprotéique. Si des plasmagènes comparables à κ interviennent dans la morphogénèse, ainsi que POULSON⁷ et nous-même⁸ l'avons suggéré, il faut s'attendre à ce qu'un choc thermique de brève durée (1 heure) à une température convenable arrête complètement le développement, sans toutefois tuer immédiatement l'embryon.

Des essais dans ce sens ont donc été effectués sur des œufs de *Rana pipens*, *Rana fusca* et *Amblystoma mexicanum*, principalement aux stades blastula et gastrula; sans entrer dans le détail de ces expériences, disons que nous avons pu confirmer le fait que la résistance des œufs aux températures supramaximales s'accroît à mesure que le développement progresse. En choisissant une température appropriée (de l'ordre de 36 à 37° suivant les espèces), tout développement peut être bloqué au stade gastrula, sans que la cytolyse ne se manifeste avant 2 à 3 jours. Cette température critique est assez constante pour une espèce et un stade donnés; elle est très proche (à 0,2 ou 0,3° près) de celle où le chauffage provoque un début de cytolyse. Si le choc thermique s'effectue à une température un peu inférieure à celle qui cause le blocage irréversible, on assiste en général à un arrêt ou à un ralentissement considérable de la morphogénèse; mais le développement ne tarde pas à reprendre, pour donner des embryons hypomorphes dont l'aspect extérieur rappelle fortement ceux qui ont été décrits par HOADLEY. L'étude microscopique de ces embryons anormaux n'a pas encore été faite.

Nous avons suggéré récemment⁹ la possibilité que le blocage du développement, qui se produit au stade jeune gastrula dans les combinaisons hybrides létales de Batraciens, pourrait être dû à une incapacité pour le noyau de synthétiser des granules ribonucléoprotéiques. On sait, par les travaux de l'école de BALTZER⁹, par ceux de

MOORE¹ et par les nôtres² que le développement de ces hybrides bloqués reprend, si on en transplante un fragment dans une gastrula normale, même d'espèce différente.

Il y avait dès lors lieu d'examiner la façon dont se comporteraient des fragments de gastrulas soumises au choc thermique, de manière à arrêter leur développement, lorsqu'on les implante dans une gastrula saine. L'opération a consisté dans une greffe intrablastocélienne de la lèvre dorsale du blastopore d'une gastrula bloquée par chauffage; le greffon provenait de jeunes gastrulas de *Rana fusca*, placées pendant une heure à 36,3°, tandis que l'hôte était une gastrula normale d'*Axolotl*. Les gastrulas chauffées et non opérées qui servaient de témoins ne se sont jamais développées et l'examen microscopique a confirmé qu'ils n'étaient le siège d'aucune morphogénèse. Quant aux embryons greffés, ils ont présenté une belle induction neurale dans 15 cas sur 18; simultanément, le greffon s'était différencié de manière plus ou moins parfaite pour donner naissance à de la chorde, des somites ou du matériel pronéphritique.

Les résultats de ces expériences sont donc entièrement identiques à ceux que nous avions obtenus précédemment dans le cas des hybrides létaux entre Anoures. Il est intéressant de noter encore que, dans les deux cas, la synthèse de l'acide ribonucléique cesse dans les gastrulas bloquées et qu'elle reprend dans les greffons lorsque ceux-ci reprennent leur développement.

Bien que l'acide ribonucléique soit un constituant caractéristique des granules qu'on a voulu identifier à des plasmagènes, il serait prématuré de vouloir conclure de ces expériences que ce sont ces particules qui ont été touchées électivement par le chauffage; d'autre hypothèses, une dénaturation des protéines par exemple, peuvent aussi rendre compte des faits. Quoiqu'il en soit, le choc thermique constitue une méthode commode et sûre pour bloquer la morphogénèse en inactivant des systèmes indispensables à la bonne marche de celle-ci. Un facteur diffusible de cellule à cellule permet au développement de se remettre en marche; une étude biochimique de ces embryons bloqués permettra peut-être d'élucider la nature de ce facteur.

J. BRACHET

Laboratoire de morphologie animale, Faculté des sciences de l'Université libre de Bruxelles, le 31 mai 1948.

Summary

If amphibian gastrulae are heated at 36 to 37°C for one hour, their development is blocked irreversibly; if, however, the dorsal lip is removed from these blocked gastrulae and implanted in a normal gastrula, its development is resumed and the host is the site of a neural induction.

¹ J. A. MOORE, J. exper. Zool. 105, 349 (1947).

² J. BRACHET, Ann. Soc. zool. Belg. 75, 49 (1944).

Cortical Changes Accompanying Maturation in Sea-Urchin Egg

As early as 1923 RUNNSTRÖM¹ stated, by observation with dark-field illumination, that the cortical layer of sea-urchin oocytes undergoes a colour change during maturation. The silver-white colour of the cortical layer of the full-grown oocyte of *Psammechinus microtuber-*

¹ J. RUNNSTRÖM, Acta Zool. 4, 285 (1923).

¹ I. LATINIK, Bull. Acad. pol. Sci. Sér. B, 1928.

² L. HOADLEY, Growth 2, 25 (1938).

³ F. E. LEHMANN, Einführung in die physiologische Embryologie, p. 345 (Birkhäuser, Basel 1945).

⁴ J. BRACHET, Embryologie chimique (Desoer, Liège 1945).

⁵ A. CLAUDE, Cold Spring Harbor Symposia 9, 263 (1941).

⁶ T. M. SONNEBORN, Advances in Genetics 1, 263 (1947).

⁷ D. F. POULSON, Am. Naturalist 79, 340 (1945).

⁸ J. BRACHET, Growth 11, 309 (1947).

⁹ F. BALTZER, Naturwiss. 28, 177 (1940).

culatus indeed turns to yellow and to orange-yellow during maturation. Colour changes were ascribed mainly to changes in the conditions of the cortical lipids. RUNNSTRÖM observed, however¹, that "die Farbenveränderung der Eioberfläche bei der Reifung nicht an ein besonderes Stadium gebunden ist, sondern daß die Veränderung allmählich vor sich geht" and that "die Auflösung des großen Keimbläschens der Oozyte erster Ordnung nicht die unmittelbare Ursache der Farbenveränderung ist". RUNNSTRÖM and MONNÉ have more recently² taken up the question again of the protoplasmic changes taking place in the egg of *Psammechinus mil.* from the Swedish west coast during maturation. They observed in particular that the cortical birefringence, which is typical of the mature unfertilized egg, is already present in the oocyte. No change can be noted in it during maturation. On the other hand MONROY and MONROY ODDO³ were unable to find any cortical birefringence in the oocytes of sea-urchins from the Gulf of Naples. They observed that birefringence appears in the course of maturation. The question seemed therefore worth investigating more thoroughly especially in connection with MONROY'S⁴ and MONROY and MONTALENTI'S observations⁵ on the cortical changes taking place in the egg at fertilization.

The investigations carried out during several breeding seasons in Naples will be briefly summarized here.

Oocytes of *Psammechinus microtuberculatus*, *Paracentrotus lividus*, *Sphaerechinus granularis*, and *Arbacia lixula*, when observed in polarized light do not exhibit, as a rule, any cortical birefringence. In some oocytes, however, a very faint cortical birefringence is evident. The birefringent layer has in such cases a greyish or silver-white interference colour. The sign of the birefringence is positive with respect to the radius. Moreover, even in oocytes in which the cortical layer is isotropic under ordinary conditions of observation, a cortical birefringence can be demonstrated on using a rotating mica-compensator.

Oocytes transferred into hypertonic sea-water (20 ml s.w. + 6 ml NaCl 2.5 N) undergo a plasmolysis which has been thoroughly studied by RUNNSTRÖM and MONNÉ⁶. As described by these investigators, oocytes plasmolyse with a smooth surface whereas mature unfertilized eggs plasmolyse with a wrinkled surface. As plasmolysis proceeds, a distinct positive cortical birefringence with polarization cross appears on the oocytes. At first the interference colour of the birefringent layer is silver-white and turns gradually to yellow and orange-yellow. However, after reaching a certain degree of plasmolytic contraction, the surface of the oocytes begins to exhibit wrinkles and the polarization cross is no longer visible. The whole surface is now bright, especially along the contour of the oocyte. The same phenomena have been observed even in the smallest oocytes.

Oocytes fixed in 20% trichloroacetic acid and observed in polarized light show a distinct positive cortical birefringence with polarization cross, because of the contraction induced by fixation. If fixation is followed by dehydration, treatment with xylol for several hours and lastly retransferring into alcohol, the cortical birefringence

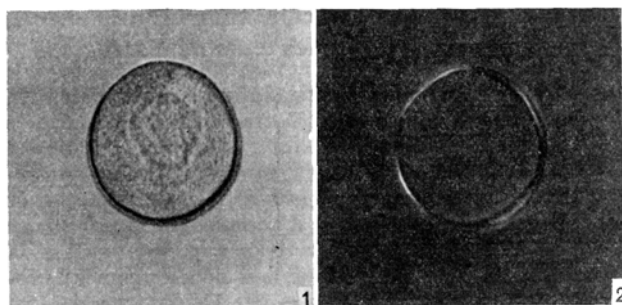


Fig. 1. – *Psammechinus microtuberculatus*. Oocyte in hypertonic sea-water: smooth plasmolysis. Note the folding of the nuclear membrane. 370 ×.

Fig. 2. – The same oocyte in polarized light showing a distinct cortical birefringence with polarization cross. 370 ×.

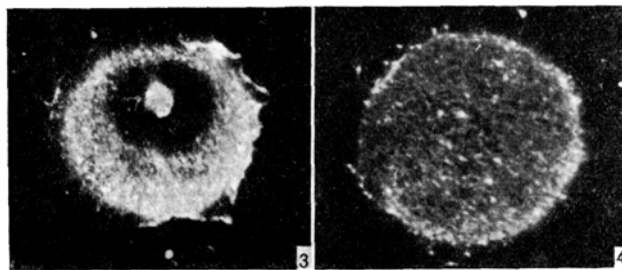


Fig. 3. – *Paracentrotus lividus*. Ashed oocyte. In the cytoplasm ashes are uniformly distributed. 700 ×.

Fig. 4. – *Paracentrotus lividus*. Ashed mature unfertilized egg. Distinct accumulation of ashes in the cortical layer. 700 ×.

ence appears as very faint and the sign has now turned to the *negative*. The extraction of lipids thus has caused the birefringence of the protein leaflets to become evident.

In oocytes left for some hours at room temperature, the maturation processes are initiated. In some specimens the appearance of a polarization cross roughly coincides with the breaking down of the germinal vesicle. In other cases that does not occur before the first polar body has been extruded. As in the case of plasmolysing oocytes, the interference colour of the birefringent cortical layer is at first silver-white. Little by little, in the course of some hours, it turns to yellow and eventually to the orange-yellow colour typical of the ripe egg. The process is completed only some time after the 2nd polar body has been extruded. The non-strict coincidence of the cortical with the nuclear changes is on the same line as the above referred observations by RUNNSTRÖM¹. Moreover RUNNSTRÖM has observed recently² that eggs are able to form a normal fertilization membrane only some time after the second maturation division.

The above referred observations show that the main constituents of the cortical layer of sea-urchin egg, i.e. protein and lipids (ÖHMAN³, MONROY⁴), are already present in the cortical layer of the oocyte. The absence of a birefringence, however, can depend either on the not yet established micellar orientation or on the too broad intermicellar spaces or on both. Progressive orientation and narrowing of the intermicellar spaces should take place during maturation. It is also likely that some new component enters the cortical layer during maturation.

¹ J. RUNNSTRÖM, Prot. 4, 388 (1928).

² J. RUNNSTRÖM and L. MONNÉ, Ark. Zool. 36 A, n:o 18 (1945).

³ A. MONROY and ODDO A. MONROY, Boll. Soc. It. Biol. sper. 20, 237 (1945).

⁴ A. MONROY, Exper. 1, 335 (1945).

⁵ A. MONROY and G. MONTALENTI, Nature 158, 939 (1946); Biol. Bull. 92, 151 (1947).

⁶ J. RUNNSTRÖM and L. MONNÉ, Ark. Zool. 36 A, n:o 18 (1945).

¹ J. RUNNSTRÖM, Prot. 4, 388 (1928).

² J. RUNNSTRÖM, Ark. Zool. 40, A, n:o 19 (1948).

³ L. O. ÖHMAN, Ark. Zool. 36 A, n:o 7 (1945).

⁴ A. MONROY, J. cell. a. comp. Physiol. 30, 105 (1947).

It must be remembered indeed that RUNNSTRÖM *et al.*¹ have shown that the so-called "cortical granules" appear in the cortical layer only after maturation has been completed. WICKLUND² has failed to find any granules of alkaline phosphatase in the cytoplasm of sea-urchin oocytes. In mature unfertilized eggs granules appear which are located in the cortical layer. It is not certain whether these granules can be identified with the "cortical granules". On the other hand I have found that in sections of oocytes, ashed according to POLICARD, ashes are uniformly distributed throughout the whole cytoplasm, whereas in mature eggs they are clearly more accumulated in the cortical layer. It is evident that the accumulation of bivalent cations in the cortical layer may increase the mutual attraction among molecules, thus narrowing the intermolecular spaces.

The changes which the cortical layer of sea-urchin oocytes undergoes during maturation are, so to speak, the reverse of those observed at fertilization. RUNNSTRÖM indeed observed long ago³ a colour change of the cortical layer at fertilization (observations with dark-field illumination) from orange-yellow to silver-white, i.e. the reverse of the one that takes place during maturation. In sea-urchin eggs of the Gulf of Naples, MONROY⁴ and MONROY and MONTALENTI⁵ observed that the cortical birefringence disappears at fertilization. That was explained as a result of a disarrangement in the submicroscopic structure of the lipo-protein cortical complex. The loss of bivalent cations which occurs at fertilization (ÖRSTRÖM and ÖRSTRÖM⁶, MONROY ODDO⁷) may play a role in this process.

The cortical birefringence seems to be, therefore, the expression of a submicroscopic structure which is bound to the ripeness, i.e. to the fertilizability of the egg.

It is interesting to note that all these cortical phenomena occurring during maturation and fertilization in sea-urchin eggs from Naples, do not occur in the eggs of the Swedish west coast, as described by RUNNSTRÖM *et al.*⁸ and as the present author was able to confirm during a stay at the Zoological Station Kristineberg, Sweden. The significance of these differences would be worth investigating.

The author wishes to express his indebtedness to Prof. J. RUNNSTRÖM for suggestions and advice. A. MONROY

The Zoological Station of Naples, May 27, 1948.

Zusammenfassung

Die Kortikalschicht der Seeigeloozyten ist isotrop. Eine kortikale positive Doppelbrechung wird erst während der Reifung sichtbar. Am Anfang ist sie ganz schwach; der normale Zustand ist nach der zweiten Reifungsteilung erreicht. Die kortikale Doppelbrechung erscheint aber auch in den Oozyten durch Plasmolyse.

¹ J. RUNNSTRÖM and L. MONNÉ, Ark. Zool. 36, A, n:o 18 (1945).
– J. RUNNSTRÖM, L. MONNÉ, and E. WICKLUND, J. coll. Sci. 1, 421 (1946).

² E. WICKLUND, Nature 161, 556 (1948).

³ J. RUNNSTRÖM, Acta Zool. 4, 285 (1923).

⁴ A. MONROY, Exper. 1, 335 (1945).

⁵ A. MONROY and G. MONTALENTI, Nature 158, 939 (1946); Biol. Bull. 92, 151 (1947).

⁶ A. ÖRSTRÖM and M. ÖRSTRÖM, Prot. 36, 475 (1941).

⁷ A. MONROY ODDO, Exper. 2, 371 (1946).

⁸ J. RUNNSTRÖM, L. MONNÉ, and L. BROMAN, Ark. Zool. 35 A, n:o 3 (1943).

Fettsäuren aus dehydratisiertem Rizinusöl mit sog. Vitamin-F-Wirkung

Bei der Verseifung von dehydratisiertem Rizinusöl ergeben sich Gemische von Fettsäuren, welche zur Hauptsache aus 9,11- und 9,12-Linolsäure bestehen. Mengemäßig überwiegt die Säure mit konjugierten Doppelbindungen. Möglicherweise sind auch noch strukturisomere Linolsäuren mit anderer Lage der Doppelbindungen in dem aus der Dehydratisierung erhaltenen Fettsäuregemisch enthalten, in welchem naturgemäß auch die übrigen im Rizinusöl enthaltenen Fettsäuren, wie Stearinsäure, Ölsäure, usw. vertreten sind. Über die geometrischen Isomerieverhältnisse dieser Linolsäuren ist nichts Näheres bekannt.

Die aus dem dehydratisierten Rizinusöl gewonnenen Fettsäuren bzw. die Linolsäuren, zeigten im Tierversuch, durchgeführt vom Schweizerischen Vitamininstitut in Basel, sog. Vitamin-F-Wirkung.

Das geprüfte Präparat stammte aus dehydratisiertem Rizinusöl Marke «Dienol» (konz. Schwefelsäure als Dehydratisierungskatalysator) und besaß folgende Daten:

Kp. 0,2 187–188,5°C.

$n_{D}^{20} = 1,4739$

Säurezahl: ber. 201,5 gef. 200,0

Jodzahl: gef. 155,0

Molekulargewicht: ber. 280,3 gef. 285,0

aktive Wasserstoffatome: ber. 0,36% gef. 0,36%

CH-Bestimmung: $C_{18}H_{32}O_2$ ber. C: 77,07% H: 11,51%

gef. C: 76,41% H: 11,89%

UV-Spektrum: Hauptbande bei 2300 Å; $\log \epsilon = 4,20$

Nebenbande bei 2700 Å; $\log \epsilon = 2,25$

Die Bestimmung der Mikrohydrierzahl ergab keine Aufnahme von Wasserstoff. Möglicherweise wird die katalytische Hydrierung durch Spuren von Schwefel verhindert, welche während der Dehydratisierung durch Reduktion des Schwefelsäurekatalysators entstanden sind.

Die Prüfung auf sog. Vitamin-F-Wirkung ergab folgende Werte:

perorale Applikation: 1 g entspricht 358 mg Linolsäure;
perkutane Applikation: 1 g entspricht 270 mg Linolsäure.

A. C. MUHR

Wissenschaftliches Laboratorium der Öl- und Chemie-Werk-AG., Hausen bei Brugg, den 2. Juni 1948.

Summary

The fatty acids from dehydrated castor oil, mainly consisting of 9,11- and 9,12-linoleic acid, show in biological tests vitamin effects similar to those of the so-called essential fatty acids.

Dosage de la streptomycine par la méthode des dilutions appliquée à *Klebsiella pneumoniae* N° 41 en milieu synthétique de Monod

Observation préliminaire

Souche et technique. *Klebsiella pneumoniae* N° 41, provenant de la N.C.T.C.¹, conservée sur gélose, souche hautement qualifiée pour le dosage de la streptomycine². Technique des dilutions classique: on ajoute au milieu des

¹ N.C.T.C. National Collection of Type Cultures. Londres.

² E. ALTURE-WERBER et L. LOEWE, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 63, 277 (1946).