

year at ordinary temperatures; but if allowed to get damp begins to deteriorate after 8 months¹.

The following Table is fairly representative of the results obtained from the above procedure (this extraction started with 1.5 kg fresh young Horse liver, passed through a moderately fine grinder):

Operation	Quantity cc	AU/cc	Total AU	% Yield
A	2,144	108	231,600	100
B	3,580	64	229,100	99
C	3,420	64	218,900	94.5
D	874	245	214,100	92.4
E	1,025	209	214,200	92.4
F	1,058	202	213,700	92.3
G	460	267	123,100	53.1
H	490	250	122,500	52.9
I	505	417	210,600	91
K*	1,960	76.6	150,100	64.8

* Including precipitation of excess cobalt.

Acknowledgements. The writer is indebted to Dr. D. M. GREENBERG, Department of Biochemistry, Medical School, University of California, for helpful suggestions, and to Dr. A. VANNOTTI, Polyclinique médicale universitaire, Lausanne, for the use of his laboratory and facilities without which this work could not have been completed.

C. B. THOMPSON²

Medical School, University of California, June 26, 1948.

Résumé

Nombreux sont les travaux qui traitent de la séparation et de la purification de l'arginase. Le présent travail décrit une méthode de purification qui permet d'obtenir une arginase active contenant des traces d'impuretés (80 % d'arginase active).

¹ Activity determined as by MOHAMED and GREENBERG, *supra*.

² Formerly Research Assistant at the Medical School, University of California.

Sur des pigments rouges de Levures

Les pigments rouges des Levures (en particulier ceux des *Torula* et espèces voisines) dont les propriétés chimiques ont été établies, appartiennent au groupe des caroténoïdes¹.

L'objet de la présente note est de décrire un groupe de pigments rouges très différent. La race de Levure qui forme ces pigments dérive d'un mutant isolé d'une lignée haploïde de *Saccharomyces cerevisiae*. En dehors de la pigmentation, elle est caractérisée par l'incapacité de proliférer en absence d'adénine ou d'hypoxanthine² dans le milieu de culture. En outre, les pigments ne se forment, dans nos conditions de culture, qu'en aérobiose et sont sujets à des variations quantitatives et qualitatives correspondant à des variations de couleur allant du rose pâle au brun foncé en passant par des teintes rouges intermédiaires.

Les pigments rouges extraits de cette Levure sont plus ou moins solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants organiques. La plupart de ces pigments se trouvent dans la

Levure sous forme de sels; les pigments précipitent après acidification et se présentent généralement sous forme de flocons amorphes rouge foncé, très solubles dans les liquides alcalines aqueuses; les sels d'Ag et Pb de ces pigments acides sont très peu solubles dans l'eau.

L'hydrolyse acide (HCl 6N pendant 24 h à 100°) détruit la couleur rouge et libère plusieurs acides aminés. La chromatographie de partage sur papier, selon CONSDEN, GORDON et MARTIN¹, nous a permis d'identifier les acides aminés suivants (les proportions relatives étant indiquées approximativement par le nombre de +): acide glutamique + + + +, glycolle + + +, sérine + +, valine + +, leucine + +, acide aspartique +, alanine +, proline +². Ils s'agit donc de toute évidence de molécules composées d'un groupement prosthétique rouge attaché à une ou plusieurs chaînes polypeptidiques plus ou moins longues. La réduction rapide de ces pigments, à température ordinaire, par SO₂ ou H₂S, ainsi que l'allure de la courbe d'absorption semble indiquer la nature quinoïde du groupement prosthétique.

L'analyse élémentaire de ces pigments qui, malgré une purification poussée, sont restés amorphes, a donné les chiffres suivants: C 33,1 à 38,7 %, H 6,1 à 7,6 %, N 8,4 à 9,1 %, P 1,4 à 3,4 %; cendres 0,39 à 0,71 %.

Les spectres d'absorption de ces pigments, qui peuvent être différenciés d'après leurs solubilité dans l'alcool aqueux, présentent une bande située aux environs de 525 mμ (détermination au spectrophotomètre de BECKMAN).

Certains des caractères chimiques et physiques indiqués ci-dessus rapprochent ces substances des pigments rouges extraits du foie et se montrant actifs contre l'anémie pernicieuse (vitamine B₁₂ et substances apparentées) que RICKES et coll., ainsi que LESTER-SMITH ont récemment décrit³.

Des essais bactériologiques sur *Lactobacillus lactis*⁴ DORNER et des tests physiologiques sont en cours⁵.

B. EPHRUSSI et E. LEDERER

Institut de génétique du C. N. R. S. et Service de biochimie, Institut de biologie physico-chimique, Paris le 26 juillet 1948.

Note ajoutée le 30 juillet 1948. - LESTER SMITH (Nature 162, 144, du 24 juillet 1948) a rapporté récemment que la vitamine B₁₂ cristallisée contient, pour un poids moléculaire de 1500, un atome de cobalt et trois atomes de phosphore. Cette découverte a été faite simultanément par les chercheurs de Merck (RAHWAY). Nous avons trouvé que nos différentes fractions de pigments de Levure contiennent également du phosphore, mais pas de cobalt. Calculé pour un poids moléculaire moyen de 2000, nos pigments contiennent un ou deux atomes de phosphore, suivant le cas⁶.

B. EPHRUSSI et E. LEDERER

¹ R. CONSDEN, A. H. GORDON et A. J. P. MARTIN, Biochem. J. 38, 224 (1944).

² Analyse de M. JUSTISZ.

³ E. L. RICKES, N. G. BRINK, F. R. KONIUSZY, T. R. WOOD et K. FOLKERS, Science 107, 396 (1948). - E. LESTER SMITH, Nature 161, 638 (1948).

⁴ M. S. SHORB, J. Biol. Chem. 169, 455 (1947); Science 107, 397 (1948).

⁵ Nous remercions le Professeur T. REICHSTEIN, Bâle, qui a bien voulu comparer quelques-unes de nos fractions avec des pigments extraits du foie.

⁶ Etant donné l'état amorphe de nos pigments, il n'est pas encore certain que les acides aminés décelés après hydrolyse fassent partie de ces pigments. La présence d'impuretés protéiques ou peptidiques n'est pas exclue.

¹ E. LEDERER, C. R. Acad. Sci. 197, 1694 (1933); Bull. Soc. Chim. biol. 20, 611 (1938). - H. FINK et E. ZENGER, Wschr. Brauerei 1934, N° 12. - CL. FROMAGEOT et J. L. TCHANG, Arch. Mikrobiol. 9, 424 et 434 (1938). - P. KARRER et J. RUTSCHMANN, Helv. chim. acta 26, 2109 (1943); 28, 795 (1945); 29, 355 (1946).

² E. TAVLITZKI, communication verbale.

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 B₁₂¹) 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.

¹ Cf. notes 3 and 4 p. 433, 2nd 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 recherches¹. 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 animale². 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° Isolement des noyaux. Divers auteurs se sont déjà préoccupés d'isoler les noyaux des tissus animaux³. 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° 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 à achever 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° 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 lamelle couvre-objet.

3° Analyse des noyaux. Nous opérons sur la suspension citrique et utilisons, avec quelques modifications, la méthode donnée par SCHNEIDER¹ 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'extract trichloracétique chaud ainsi obtenu, on dose l'acide nucléique total par les purines, après une hydrolyse de 2 heures à 100° en milieu ClH N.; les purines sont évaluées par notre microtechnique de précipitation cuivreuse². 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 extract trichloracétique chaud, on dose en outre l'acide désoxyribonucléique par la technique colorimétrique de DISCHE³ à la diphenylamine et l'acide ribonucléique par la technique colorimétrique de VON EULER⁴ 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 THANNHAUSER⁵

¹ 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.

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

³ G. CROSSMAN, 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).

¹ W. C. SCHNEIDER, J. Biol. Chem. 161, 293 (1945).

² R. VENDRELY et R. SARCIRON, Bull. Soc. Chim. biol. 26, 214 (1944).

³ Z. DISCHE, Mikrochemie 8, 4 (1930).

⁴ H. V. EULER et L. HAHN, Svenks kem. Tidskr. 58, 251 (1946).

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