

d) Trypaflavin: Je 6  $\gamma$ , 30  $\gamma$ , 150  $\gamma$  pro Kubikzentimeter Substrat.

Jeder Versuch wurde in 5 oder 10 parallel laufenden Wiederholungen durchgeführt. Nach 8 Wochen wurden die mittleren Durchmesser der Algenkulturen bestimmt und die Messungen statistisch bearbeitet. Die Resultate aus den Klonen 1 und 2 sind in der Tabelle dargestellt. Die Zahlen bedeuten den durchschnittlichen Koloniedurchmesser in Millimeter.

Zusatz zum Substrat	<i>Cystococcus</i>	<i>Coccomyxa</i>
Kontrolle . . . . .	10,7 $\pm$ 0,64	4,9 $\pm$ 0,10
Streptomycin 1 $\gamma$ pro cm <sup>3</sup> . . . . .	5,0 $\pm$ 0,42	4,1 $\pm$ 0,28
10 $\gamma$ pro cm <sup>3</sup> . . . . .	0	2,6 $\pm$ 0,18
25 $\gamma$ pro cm <sup>3</sup> . . . . .	0	0
Penicillin 0,2 $\gamma$ pro cm <sup>3</sup> . . . . .	14,0 $\pm$ 0,57	5,0 $\pm$ 0,15
1 $\gamma$ pro cm <sup>3</sup> . . . . .	13,4 $\pm$ 0,50	5,3 $\pm$ 0,33
5 $\gamma$ pro cm <sup>3</sup> . . . . .	12,8 $\pm$ 0,66	6,0 $\pm$ 0,57
Trypaflavin 6 $\gamma$ pro cm <sup>3</sup> . . . . .	10,5 $\pm$ 0,63	5,1 $\pm$ 0,28
30 $\gamma$ pro cm <sup>3</sup> . . . . .	10,0 $\pm$ 0,77	4,9 $\pm$ 0,10
150 $\gamma$ pro cm <sup>3</sup> . . . . .	0	4,9 $\pm$ 0,29

*Cystococcus* ist die empfindlichste Alge. 1  $\gamma$  Streptomycin pro Kubikzentimeter Substrat hemmt das Wachstum eindeutig, ohne aber die Kolonien zum Absterben zu bringen. Mikroskopisch zeigten die Zellen keine Unterschiede gegenüber solchen aus den Kontrollkolben. Auch Zoosporen bildeten sich in unverminderter Zahl. Wurden Algen von diesem Substrat nach 8 Wochen auf Kontrollböden geimpft, so wuchsen sie normal weiter. Die höheren Streptomycindosen töteten die Alge ab: In keinem Fall waren Zellen, nach 8 Wochen aus diesen Kolben auf Kontrollböden geimpft, zum Wachstum zu bringen. Die größere Flächenentwicklung der Alge in den Penicillinkolben ist auf eine flachere Wachstumsform der Kolonien zurückzuführen, die durch eine geringere Festigkeit des Substrates verursacht wurde.

*Coccomyxa* wurde erst durch eine Dosis von 25  $\gamma$  Streptomycin pro Kubikzentimeter Nährboden abgetötet. Auch gegenüber Trypaflavin ist der Klon widerstandsfähiger als *Cystococcus*.

*Trentepohlia* wächst bedeutend langsamer als die beiden anderen Stämme. Die Wuchsform der Kolonien ist halbkugelig oder noch mehr überhöht, so daß der Durchmesser der Kolonien kein zuverlässiges Maß für das Wachstum der Alge darstellt. Eindeutig ergab der Versuch eine Wachstumshemmung der Alge auf dem Substrat mit der höchsten Streptomycindosis. Penicillin und Trypaflavin beeinflussten die Entwicklung nicht.

Den Herren Prof. Dr. E. GÄUMANN und Prof. Dr. O. JAAG danke ich sehr für die Ermöglichung der vorliegenden Arbeit und das ihr entgegengebrachte Interesse.

ALFONS ZEHNDER

Institut für spezielle Botanik der ETH. Zürich, den 1. Mai 1950.

### Résumé

On a étudié l'influence de la streptomycine, de la pénicilline et de la trypaflavine sur le développement de trois chlorophycées appartenant aux genres *Cystococcus*, *Coccomyxa* et *Trentepohlia*. La streptomycine ralentit ou supprime – selon sa concentration – le développement des algues, tandis que la pénicilline n'a aucune influence. La trypaflavine supprime, en concentration élevée, la croissance du *Cystococcus*, mais n'influence pas le développement des deux autres espèces.

### Evolution des granules cytoplasmiques et conditions de synthèse des ribonucléoprotéines

Depuis les travaux de CASPERSSON<sup>1</sup>, BRACHET<sup>2</sup>, etc., la relation entre acide ribonucléique et synthèse de protéines a été maintes fois proposée; avec la découverte des «granules cytoplasmiques», isolables par centrifugation différentielle (CLAUDE<sup>3</sup>, BRACHET<sup>4</sup>, CHANTRENNE<sup>5</sup>, etc.), cette relation s'est sensiblement précisée et récemment JEENER<sup>6</sup>, utilisant des solutions salines concentrées, mettait en évidence des procès de dissociation des granules qui semblent confirmer que la synthèse des protéines cellulaires s'effectuerait au niveau des organites les plus lourds et les plus riches en équipements enzymatiques divers.

Il est cependant un autre aspect du problème de l'organisation cellulaire qui, jusqu'à présent, semble n'avoir suscité que peu de travaux: il s'agit des conditions de synthèse des nucléoprotéines elles-mêmes. Or, dans une série de recherches consacrées aux mécanismes de la fécondation chez *Ascaris megalocephala* (PANIJEL<sup>7</sup>), nous avons montré que l'apport d'une protéine spécifique par le spermatozoïde permettait une synthèse spectaculaire de granules ribonucléoprotéiques dans le cytoplasme ovulaire et que cette synthèse s'effectuait au niveau même de la protéine. Ultérieurement, nous avons indiqué (PANIJEL<sup>8</sup>, PANIJEL et PASTEELS<sup>9</sup>) qu'il s'agissait d'une véritable «recharge» en granules organisés et que cette recharge s'effectuait en deux étapes: l'une comportant la synthèse des ribonucléoprotéines à l'échelon moléculaire («le surnageant» des expériences de centrifugation), l'autre l'inclusion de ces ribonucléoprotéines dans les granules qui sont ensuite progressivement redistribués dans le cytoplasme. Nous voudrions apporter ici un nouvel exemple de procès biochimiques du même ordre qu'il nous a été donné d'étudier sur un matériel analogue.

Avant nous, PASTEELS<sup>10</sup> (cf. PANIJEL<sup>11</sup>) a, en effet, précisé que, lors de la spermatogénèse chez *Ascaris*, les granules cytoplasmiques étaient éliminés lors des divisions de maturation sous forme d'une hernie violemment basophile (le «cytophore» des auteurs). Nous avons montré (PANIJEL<sup>11</sup>) que cette élimination était en relation étroite avec les procès de dissociation des petits granules qui accompagnent les synthèses de protéines deutoplasmiques et que, sous une autre forme, de tels procès se retrouvaient également lors des oogenèses léctithiques. – Mais, ici, le fait qui doit retenir notre attention, c'est que si le matériel basophile du «cytophore» (cf. fig. 1–4) résulte bien, en effet, de l'accumulation des granules cytoplasmiques, il présente cependant un aspect et une structure qui le particularisent singulièrement et le différencient nettement des matériels basophiles usuels. En premier lieu, il manifeste une forte métachromasie; en second lieu, il est possible de montrer par l'emploi des

<sup>1</sup> T. CASPERSSON, Naturwiss. 29, 33 (1941).

<sup>2</sup> J. BRACHET, Enzymologia 10, 1, 87 (1941).

<sup>3</sup> A. CLAUDE, Cold Spring Harbor 9, 263 (1941).

<sup>4</sup> J. BRACHET, Embryologie Chimique (Paris 1947); C. r. Soc. Biol. 142, 1241 (1948).

<sup>5</sup> H. CHANTRENNE, Bioch. Biophys. Acta 1, 387 (1947).

<sup>6</sup> R. JEENER, Bioch. Biophys. Acta 2, 633 (1948).

<sup>7</sup> J. PANIJEL, Bull. Soc. Chim. Biol. 29, 1098 (1947); 30, 116 (1948); 31, 510 (1949).

<sup>8</sup> J. PANIJEL, Bull. Soc. Chim. Biol. 31, 1, 387 (1949).

<sup>9</sup> J. PANIJEL et J. PASTEELS, à paraître Arch. de Biol. 1951.

<sup>10</sup> J. PASTEELS, Arch. Biol. 59, 4, 405 (1948).

<sup>11</sup> J. PANIJEL, Thèse principale (Paris 1950). «Le métabolisme des nucléoprotéines dans la gamétogénèse et la fécondation.» A paraître (Hermann ed., Paris 1951).

solvants neutres (PANIJEL<sup>1</sup>) que les conditions de solubilité de ces ribonucléoprotéines les apparentent à celles du nucléole et non à celles que l'on rencontre généralement dans les cytoplasmes.

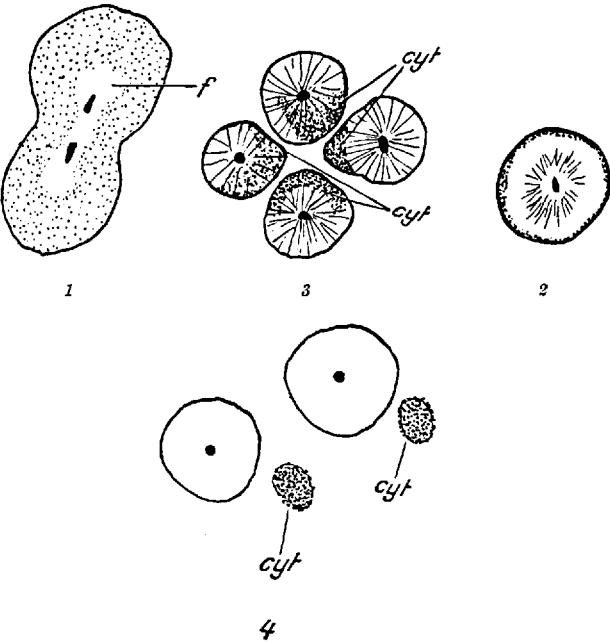


Fig. 1-4. – Etapes progressives lors de la deuxième division de maturation de l'accumulation des granules dans le cytophore et de son élimination.

Ces observations nous conduisaient à considérer que l'élimination de la basophilie cytoplasmique, correspondant, nous l'avons dit, à la dissociation des petits granules, devait se présenter sous forme d'éléments de structure différente de celle des petits granules.

Nous avons pu confirmer cette conception par l'emploi des méthodes de centrifugation différentielle. – Les résultats des analyses sont les suivants:

a) Dosage de l'acide ribonucléique total (méthode de DAVIDSON et WAYMOUTH<sup>2</sup>):

Jeunes spermatocytes: 0,688 mg % (poids sec);  
spermatides avec cytophores: 0,085 mg % (poids sec);  
spermatides sans cytophores: 0,005 mg % (poids sec).

Le fait est donc hors de doute: comme le prouve l'expérimentation cytochimique, le cytophore contient bien de l'acide ribonucléique.

b) Expériences de centrifugation différentielle (en KCl M); définition des fractions en:

G. G. (gros granules: 20 min. de centrifugation à 6000 g);  
M. G. (moyens granules: 10 min. de centrifugation à 100 000 g);  
P. G. (petits granules: 1 h. 30 min. de centrifugation à 100 000 g);

S. (surnageant restant après sédimentation de P. G.).

On voit donc que la séparation du cytophore correspond bien à l'élimination de la quasi-totalité de l'acide ribonucléique résiduel et que celui-ci appartient alors aux éléments les plus légers, comme le prouve le taux élevé en acide ribonucléique du surnageant au seul moment de la séparation du cytophore. Or il y a de

<sup>1</sup> J. PANIJEL, *Thèse complémentaire* (Paris 1950). – «Les problèmes de l'histochimie et la biologie cellulaire.» A paraître, Hermann ed. (Paris 1951).

<sup>2</sup> J. DAVIDSON et C. WAYMOUTH, *Bioch. J.* 38, 379 (1944).

	N <sup>1</sup>	RNA <sup>2</sup>	RNA/N <sup>3</sup>
<i>Jeunes spermatocytes</i>			
Gros granules . . . . .	90	49	544
Moyens granules . . . . .	25	41	1640
Petits granules. . . . .	130	251	1930
Surnageant . . . . .	98	43	439
<i>Spermatides et cytophores</i>			
Gros granules . . . . .	110	62	563
Moyens granules . . . . .	48	67	1343
Petits granules. . . . .	94	169	1798
Surnageant . . . . .	240	260	1083
<i>Spermatides</i>			
Gros granules . . . . .	33	18	600
Moyens granules . . . . .	28	36	1295
Petits granules. . . . .	12	19	1583
Surnageant . . . . .	18	7	388

<sup>1</sup> γ N par cm<sup>3</sup> de suspension.  
<sup>2</sup> γ R. N. A. par cm<sup>3</sup> de suspension.  
<sup>3</sup> γ R. N. A. par mg de N.

bonnes raisons de penser que les éléments du dit surnageant sont de dimensions moléculaires: on est donc amené à considérer comme très vraisemblable le fait que, dans le cas de la spermatogénèse d'*Ascaris*, la dissociation des petits et moyens granules (qui accompagne la synthèse d'une protéine caractéristique à valeur de vitellus<sup>1</sup>) aboutit à la formation de ribonucléoprotéines moléculaires. Or, ce procès qui est l'inverse de celui que nous avons mis en évidence dans le cas de la recharge de l'œuf lors de la fécondation (PANIJEL<sup>2</sup>) est lui-même réversible: en effet, les cytophores, après leur séparation des spermatides, sont phagocytés par les cellules pariétales testiculaires; on constate alors que les zones de cytoplasme entourant les vacuoles où sont inclus les cytophores se rechargent progressivement en basophilie cytoplasmique typique, au fur et à mesure que s'effectue la digestion des cytophores (cf. fig. 5).

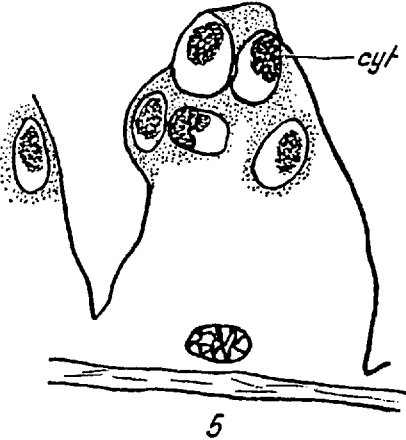


Fig. 5. – Attaque des cytophores dans les cellules pariétales et apparition de la basophilie cytoplasmique.

Les ribonucléoprotéines des cytophores sont donc d'abord synthétisées sous forme moléculaire, puis organisées au sein des granules cytoplasmiques.

<sup>1</sup> J. PANIJEL, *Thèse principale* (Paris 1950). – «Le métabolisme des nucléoprotéines dans la gamétogénèse et la fécondation.» A paraître, Hermann ed. (Paris 1951).

<sup>2</sup> J. PANIJEL, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 29, 1098 (1947); 30, 116 (1948); 31, 510 (1949).

On voit donc que ces résultats permettent d'envisager l'organisation des granules comme un procès en deux étapes: la première comportant une synthèse moléculaire de ribonucléoprotéines, la seconde la formation des granules eux-mêmes à partir de ce matériel. On sait combien, par de nombreux aspects, les virus sont proches des granules cytoplasmiques: il serait tentant de supposer que le schéma de synthèse des granules auquel conduisent nos observations s'applique également à la multiplication des virus (et des bactériophages); en effet on sait que le pouvoir infectieux, lors des synthèses de virus, apparaît brusquement et augmente très rapidement après une période de latence où il reste extrêmement faible. Il est possible que cette période de latence corresponde à l'étape de synthèse moléculaire et que le pouvoir infectieux n'apparaisse que lors de la seconde étape: c'est-à-dire après organisation des particules à partir de ce matériel transformable.

Des recherches en cours nous permettront, nous l'espérons, de préciser de tels procès qui nous paraissent directement liés aux conditions d'autocatalyse des systèmes protéiques.

JACQUES PANIJEL

Institut de recherches sur le Cancer de l'Université de Paris et du C.N.R.S., Service de Biochimie, Villejuif (Seine), le 15 juin 1950.

#### Summary

It has been observed that during the spermiogenesis of *Ascaris megalocephala* a rapid and considerable elimination of R.N.A. takes place. This process is due to the dissociation of cytoplasmic granules into molecular elements (supernatant). Reciprocally, during the phagocytosis of R.N.A. eliminated by the parietal cells, formation of granules from the supernatant has been observed. The conditions of synthesis of cytoplasmic granules and the relations with the elements of molecular size (supernatant) are discussed.

### Preparation of Rabbit Anti-Serum for Rat-Liver Mitochondria. Its Action on Mitochondria Succinoxidase

Many techniques have been described for the isolation in a state of high purity of nuclei, mitochondria, and microsomes from cells<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> G. CROSSMAN, *Science* **85**, 250 (1937). – C. A. STONEBURG, *J. Biol. Chem.* **129**, 189 (1939). – R. VENDRELY et C. VENDRELY, *Exper.* **4**, 434 (1948). – A. L. DOUNCE, *J. Biol. Chem.* **147**, 695 (1943). – R. R. BENSLEY and N. L. HOERR, *Anat. Rec.* **60**, 251 (1934). – A. LAZAROW, *Biol. Symp. Lancaster* **10**, 9 (1943). – E. S. G. BARRON, *Biol. Symp. Lancaster* **10**, 27 (1943). – A. CLAUDE, *J. Exp. Med.* **80**, 19 (1944). – W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.* **165**, 585 (1946). – W. C. SCHNEIDER, G. H. HOGEBOOM, and G. E. PALLADE,

In this paper the preparation of rabbit anti-rat liver mitochondria serum and its action on mitochondria succinoxidase are described.

Mitochondria were isolated from rat liver according to HOGEBOOM *et al.*<sup>1</sup>. After washing 4–5 times in 0.88 M sucrose solution to remove traces of foreign proteins, they were suspended in 3 ml of 0.15 M NaCl and injected intravenously into a normal rabbit. 8 inoculations were made at 3 day intervals, using BESREDKA's technique to avoid anaphylactic shock. Antibodies cannot be demonstrated by agglutination, since spontaneous agglutination of mitochondria occurs in the presence of electrolytes. The immune serum produced a rapid heavy agglutination, which is different from the microagglutination produced by salts, but it was found that an entirely similar phenomenon occurs with normal sera of rabbits, rats, and guinea pigs.

Lysis in presence of complement may be employed, but great caution must be used, since after a few hours spontaneous lysis occurs also without immune serum. Lysis is specific only if it occurs within 1–2 hours. Microscopic observation shows a rapid swelling of the mitochondria in presence of immune serum and complement, which is followed by complete destruction. When lysis occurs, a thick protein precipitate can be observed. But the best method for antibody demonstration was complement fixation. The titrations were performed by using serial dilutions of inactivated immune serum (1.0 ml), 0.05 ml of fresh guinea pig complement pooled from the blood of 3 animals, and 0.5 ml of a mitochondrial suspension containing the mitochondria isolated from 1 g of rat liver or kidney in 10 ml of saline. The tubes were incubated at 37.5°C for 1 hour, and sensitized sheep cells were added as usual.

In presence of rat liver mitochondria, the titers were up to 1:1280, in presence of rat kidney mitochondria up to 1:50 in some instances, whereas no fixation was observed when mitochondria from either liver or kidney of mice, guinea pigs or rabbits were used.

The action of anti-mitochondria serum on the succinoxidase system contained in mitochondria from both liver and kidney was tested in the Warburg apparatus, with 0.2 M sodium succinate added (Table I).

Washed mitochondria isolated from 1 g liver or 0.5 g kidney were evenly suspended in 9.5 ml phosphate buffer ( $p_H$  7.4) in Warburg vessels (3.0 ml of mitochondrial suspension + 0.2 ml sodium succinate and 0.2 ml 20% KOH in each vessel). Each determination was made in triplicate. 0.1 ml of inactivated anti-rat

*J. Biol. Chem.* **172**, 619 (1948). – G. H. HOGEBOOM, A. CLAUDE, and R. D. HOTCHKISS, *J. Biol. Chem.* **165**, 615 (1946). – W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.* **176**, 259 (1948). – E. P. KENNEDY and A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.* **172**, 847 (1948). – G. H. HOGEBOOM, *J. Biol. Chem.* **177**, 847 (1949).

<sup>1</sup> G. H. HOGEBOOM, A. CLAUDE, and R. D. HOTCHKISS, *J. Biol. Chem.* **165**, 615 (1946).

Table I

Action of rabbit anti-serum for rat liver mitochondria on succinoxidase activity of purified mitochondria. (Average values of the percentual acceleration of activity.)

No. of expts.	Source of mitochondria	Liver		Kidney	
		serum	serum + complement	serum	serum + complement
7	rat	$-10.31 \pm 2.35$	$+20.16 \pm 7.09$	$+17.01 \pm 2.31$	$+30.60 \pm 6.48$
2	mouse	$+20.13 \pm 0.34$	$+30.64 \pm 5.48$	—	—
1	guinea pig	$+16.16$	$+24.12$	$+7.12$	$+24.13$
1	rabbit	$+21.49$	$+22.79$	$+18.94$	$+25.75$