

and incubated at 38°C for 1 and for 2 h. As shown in Table II, succinoxidase activity of mitochondria isolated from incubated homogenates is remarkably lower than that of mitochondria isolated from fresh homogenates.

In other experiments, the effect of the incubation with supernatant fluid on the succinoxidase activity of isolated mitochondria was studied. Mitochondria from 1 g of liver were suspended into 12 ml of 0.067 M phosphate buffer, divided into 4 aliquots of 3 ml each and allowed to stand in a thermostat at 38°C. 2 ml of the supernatant fluid coming from the same homogenate were added to 3 of 4 aliquots, while the first one was used as a control at time 0. Succinoxidase activities of incubated aliquots were tested after 1, 2, 3 h. After the incubation time,

Table III
Influence of incubation with supernatant fluid on succinoxidase activity of isolated mitochondria

	Non-incubated controls	Samples incubated with supernatant fluid for		
		1 h	2 h	3 h
Number of experiments . .	3	3	3	3
QO ₂ (N)	211.9	185.2	174.4	155.9
σ ±	3.5	4.4	5.0	5.2
Inactivation %		12.6	17.7	26.4

each sample was submitted to a centrifugation at 22,000 g for 30 min and succinoxidase activity was tested on the sediment. As shown in Table III, incubation with the supernatant fluid produces a definite inactivation of the enzymatic activity. This inactivation did not occur when mitochondria were incubated with boiled, instead of with crude, supernatant fluids. Potentiometric determinations of pH of the suspensions were made after 3 h of incubation, but the very slight decrease which was observed seemed not sufficient to justify such a strong inactivation of enzymatic activity.

In another group of experiments, the influence of the microsome fraction on mitochondria succinoxidase was studied after incubation for 1, 2 and 3 h at 38°C, but no influence was observed.

It appears that one or more principles, probably of enzymatic nature, contained in the supernatant fluid are responsible for the inactivation phenomenon observed.

M. U. DIANZANI

Department of General Pathology, University of Genoa, March 8, 1953.

Résumé

L'auteur a étudié l'action des liqueurs surnageantes après la sédimentation des mitochondries et des microsomes de l'homogénate de foie sur l'activité succinoxidase des mitochondries isolées. Il a trouvé une action inhibitrice qui disparaît après ébullition. Les microsomes n'ont aucune influence.

Substances fluorescentes du type ptérinique dans la peau ou les yeux de la grenouille (*Rana nigromaculata*) et leurs transformations photochimiques

GODA¹, en 1941, a nommé une substance fluorescente isolée de la peau dorsale de *Rana nigromaculata*. Selon

lui, le pyrrol-chrome joue un rôle physiologique important.

Nous avons signalé dans d'autres travaux les propriétés des substances fluorescentes du type ptérinique des divers animaux (vers à soie¹, papillon, carpe², crapaud³, grenouille⁴, etc.) et le rôle de telles substances dans la mélanogénèse⁵.

Nous donnerons ici brièvement nos résultats sur les substances fluorescentes de *Rana nigromaculata*.

1° Présence de plusieurs substances fluorescentes dans la peau dorsale (noire) et ventrale (blanche), dans les yeux, et leurs propriétés. Nous avons proposé le nom collectif de «rana-chrome» pour les substances fluorescentes extraites de tels tissus par le méthanol, l'ammoniaque ou l'acide acétique. Les rana-chromes sont des substances désignées ici (Tableau) par des chiffres (1-6) qui correspondent aux termes d'une échelle basée sur la valeur décroissante de *Rf* (dissolvant; butanol: acide acétique: eau 4: 1: 1) du chromatogramme sur papier.

On découpe ces taches fluorescentes du chromatogramme et on en extrait la substance par le méthanol, l'ammoniaque ou l'eau. Ainsi nous avons examiné les propriétés et les spectres d'absorption des pigments, dont quelques-uns ont pu être rapportés à des substances déjà connues (Tableau).

Les rana-chromes sont en général thermostables. Le rana-chrome 1 est un cristal cubique, coloré en jaune clair, dont la solution aqueuse a la fluorescence bleu ciel. Cette substance correspond donc au pyrrol-chrome même et n'est pas tout à fait identique à la fluorescyanine qui pourtant avait été désignée comme étant le pyrrol-chrome par les savants français⁶ (voir Tableau).

Propriétés de plusieurs substances fluorescentes isolées de la peau et les yeux de *Rana nigromaculata*

Substances fluorescentes	Couleur de la fluorescence à pH 7	Valeur de <i>Rf</i>
Rana-chrome 1, pyrrol-chrome	bleu ciel	0,46
Rana-chrome 2, riboflavine	jaune	0,43
Rana-chrome 3	bleu ciel	0,40
Rana-chrome 4, fluorescyanine ou ichtyoptérine (?)	violet	0,33
Rana-chrome 4B	bleu ciel	0,24
Rana-chrome 5, acide d'ANGIER	bleu ciel	0,22
Rana-chrome 6, flavine-adénine-dinucléotide . . .	jaune	0,06

Le rana-chrome 4 est un cristal aculéiforme blanc. La solution aqueuse présente une fluorescence violette, elle est réductible par l'hydrosulfite, mais récupère, par simple agitation dans l'air, sa fluorescence. D'ailleurs, cette substance a donné jusqu'à présent la même valeur

¹ T. HAMA, H. ARUGA et Y. MAKI, Zool. Mag. 58, 219 (1949).
² T. HAMA, T. GOTO et K. KUSHIBIKI, Science (Japon) 22, 478 (1952). Il y a deux sortes de Cyprinus purple *A* et *B* dans la peau et les écailles de la carpe, la première correspond à la fluorescyanine.
³ T. HAMA, T. GOTO, K. OI et K. KUSHIBIKI, Science (Japon) 22, 542 (1952). Nous avons nommé «Bufo-chrome» une substance isolée de la peau du *Bufo vulgaris*, leur solution aqueuse ayant la fluorescence bleue ciel.
⁴ T. HAMA, Zool. Mag. 61, 89 (1952).
⁵ T. HAMA et T. GOTO, Zool. Mag. 61, 88 (1952).
⁶ M. POLONOVSKI, P. GONNARD et A. BARIL, Enzymologia 14, 311 (1951).

¹ T. GODA, J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo, Sec. IV 5, 305 (1941).

Rf que celle de la fluoresceyanine¹ ou de l'ichtyoptérine², même si l'on emploie plusieurs dissolvants. Mais, nous pensons que le rana-chrome 4, quoique très semblable, n'est pas identique à la fluoresceyanine, puisque la première se décompose à la lumière comme on le voit plus loin.

Le rana-chrome 5 est obtenu en poudre amorphe, colorée en brun jaunâtre, sa solution aqueuse ayant une fluorescence bleu ciel.

On retrouve les mêmes substances fluorescentes en grande quantité dans la peau dorsale et en moindre quantité dans la peau ventrale, sans tenir compte de leur contenu en riboflavine, car cette riboflavine ne se trouve que dans la peau du dos et n'existe pas dans celle du ventre.

2° Transformation photochimique du rana-chrome. A la lumière, chaque solution aqueuse du rana-chrome 1, rana-chrome 3 ou rana-chrome 4 se transforme assez facilement en rana-chrome 5.

D'autre part, il est connu que l'acide folique se décompose à la lumière en donnant deux substances fluorescentes, l'une est l'acide 2-amino-4-hydroxy-ptéridine-6-carboxylique³ (acide d'ANGIER⁴).

En comparant le rana-chrome 5, l'acide d'ANGIER synthétisé⁵ au composant décomposé de l'acide folique⁵, nous avons constaté que leurs couleurs, fluorescences, spectres d'absorption et valeur *Rf* (phénol ammoniacal, butanol-acétique, butanol-alcoolique, NH_4Cl à 3% ou acide acétique à 10% comme dissolvants⁶) sont tout à fait les mêmes.

Tous ces faits nous ont conduits à la conclusion que le rana-chrome 5 n'est que l'acide d'ANGIER. Nous avons déjà insisté sur ce fait dans une note précédente⁷.

3° Libération du rana-chrome lié à la lumière. Une partie du rana-chrome est extractible très facilement par diverses solutions, mais l'autre ne s'extraît qu'à peine par dénaturation (par exemple: bouillonnement après dialyse complète), et pour les extraire parfaitement on a besoin de la complète hydrolyse alcaline ou acide ou de la destruction enzymatique.

Nous avons d'ailleurs démontré en utilisant la chromatographie sur papier que si on expose les rana-chromes dans un milieu neutre, alcalin ou acide à la lumière, il y a une augmentation considérable de la fluorescence et en même temps la transformation photochimique en rana-chrome 5, que nous avons décrite précédemment.

Ces résultats nous ont conduits à l'idée que certains des rana-chromes existent à l'état libre et d'autres sont associés à des couples protidiques (par exemple: nucléoprotéine extraite de la peau dans la même espèce).

Les faits dont nous avons parlé plus haut suggèrent que le rana-chrome joue un rôle physiologiquement important ayant rapport à l'acide folique et aussi quelque rôle sur la fonction oculaire.

Ce travail a été exécuté avec la subvention pour les recherches scientifiques du Ministère de l'éducation.

T. HAMA

Laboratoire biologique de l'Université de Kéio, Japon, le 19 janvier 1953.

¹ M. POLONOVSKI, R. G. BUSNEL et M. PESSON, C. r. Acad. Sci. Paris 217, 163 (1943).

² R. HÜTTEL et G. SPRENGLING, Ann. Chem. 554, 69 (1943).

³ S. KUWADA et T. MASUDA, Vitamine (Japon) 3, 261 (1951).

⁴ M. POLONOVSKI, P. GONNARD et A. BARIL, Enzymologia 14, 311 (1951).

⁵ Cette matière nous a été fournie par le Dr S. KUWADA, directeur de l'Institut des Recherches de la Fabrique pharmaceutique Takéda. Nous l'en remercions infiniment.

⁶ R. TSCHESCHE et F. KORTE, Ber. dtsch. chem. Ges. 84, 801 (1951). – Y. HIRATA, S. NAWA, S. MATSUURA et H. KAKIZAWA, Exper. 8, 339 (1952).

⁷ T. HAMA, Zool. Mag. 61, 89 (1952).

Summary

We proposed the collective name of "Rana-chrome" for the fluorescent substances isolated from the skin and eyes of *Rana nigromaculata*. Pyrrol-chrome corresponds to Rana-chrome 1, Rana-chrome 4 is the same as or very similar to fluoresceyanine or ichtyopterin. Each of Rana-chrome 1, Rana-chrome 3 or Rana-chrome 4 transforms into Rana-chrome 5 on irradiation. Data available permit assigning to Rana-chrome 5 the structure of a 2-amino-4-hydroxy-ptéridine-6-carboxylic acid, one component of the photolysis of folic acid.

If the neutral, acid or alkaline solution of Rana-chromes extracted from skin is exposed to the light, there occurs a considerable augmentation of fluorescence. From the observations reported in this paper, it is suggested that some of Rana-chromes exist in free state and the others are associated with proteins.

Etude physiologique du parasitisme de l'*Uromyces Pisi* (Pers.) de By, sur l'*Euphorbia Cyparissias* L.

I. – Premières observations¹

Le parasitisme de l'*Euphorbia Cyparissias* par l'*Uromyces Pisi* a été étudié du point de vue morphologique, anatomique et cytologique par quelques auteurs parmi lesquels il convient de citer SCHRÖTER², JORDI³, MASSALONGO⁴, STÄMPFLI⁵, TISCHLER⁶ surtout et MOEHKE⁷. Nous relèverons l'essentiel des troubles morphologiques présentés par les plantes parasitées (Fig. 1):

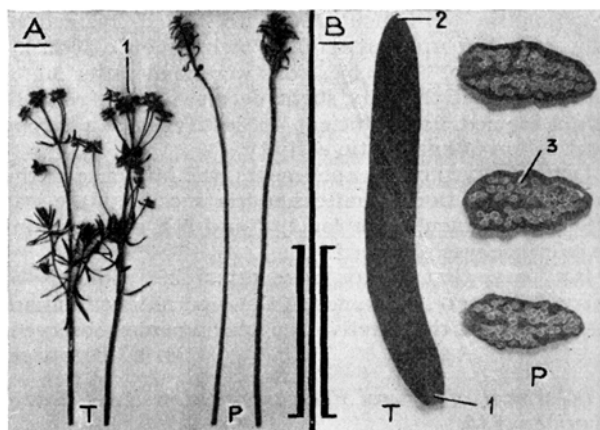


Fig. 1. A Plantes complètes; T Témoins; P Parasitées; 1 Fleur. Echelle: le trait = 10 cm. B Feuilles; 1 Base; 2 Pointe; 3 Conceptacle écidien. Echelle: le trait = 1 cm.

1° Les tiges ne sont pas ramifiées en général; plus longues et plus grêles, elles résistent mieux en culture.

2° Les feuilles sont plus courtes, plus larges et plus épaisses; en général jaune pâle, elles adoptent une forme en cuiller et tombent prématurément.

¹ Je tiens à remercier M. CH. TERRIER (Station fédérale d'essais) pour les nombreux renseignements bibliographiques qu'il a bien voulu me communiquer.

² J. SCHRÖTER, Hedwigia 15, 98 (1875).

³ E. JORDI, Zbl. Bakt. Parasit. Infektionskrankh. 13, 64 (1904).

⁴ C. MASSALONGO, Bull. Soc. bot. ital. 158, 000 (1905).

⁵ R. STÄMPFLI, Hedwigia 49, 230 (1904).

⁶ G. TISCHLER, Flora 104, 1 (1911).

⁷ L. MOEHKE, Bot. Arch. 18, 347 (1927).