

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-pteridine-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 MOEHKKE⁷. Nous relèverons l'essentiel des troubles morphologiques présentés par les plantes parasitées (Fig. 1):

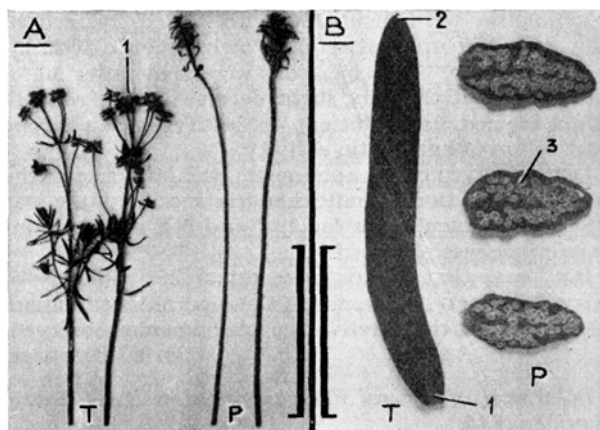


Fig. 1. A Plantes complètes; T Témoins; P Parasitées; 1 Fleur. Echelle: le trait = 10 cm. B Feuilles; 1 Base; 2 Pointe; 3 Conceptacle écidien. Echelle: le trait = 1 cm.

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. MOEHKKE, Bot. Arch. 18, 347 (1927).

3° Les fleurs sont en général atrophiées.

Du point de vue physiologique, il faut signaler le travail de MARESQUELLE¹, dans lequel cet auteur observe entre autre que la respiration des plantes parasitées par l'UROMYCES est plus active que celle des tissus indemnes. Dans son étude consacrée au parasitisme provoqué par des champignons, THATCHER² aborde le problème de la perméabilité des cellules parasitées et GUYOT³ distingue plusieurs races biologiques d'*Uromyces* susceptibles de provoquer des troubles morphologiques différents⁴.

II.—Distribution des auxines

a) Historique. En étudiant les hormones du *Rhizopus* *suinus*, THIMANN⁵ montre que ce champignon est capable, à partir du tryptophane, de synthétiser l'hétéro-auxine. WEBER⁶ prouve l'action de l'acide *b*-indolyl-acétique sur le développement du *Saccharomyces*. HAWKER⁷, sur le *Melanospora destruens*, prouve que les hormones de croissance n'agissent qu'en présence de biotine et d'aneurine. DEFAGO⁸ étudie l'effet de l'aneurine et de l'hétéroauxine sur la croissance de parasites de *Triticum*. KÖGL et VERKAAIK⁹ constatent que le *Phycomyces* contient surtout de l'hétéroauxine et 4 % d'auxines

dont les 96 % seraient détruits par la lumière. MORQUER et NYSTERAKIS¹ notent que l'hétéroauxine augmente la perméabilité et la plasticité des membranes du *Candida albicans* et favorise son accroissement. BERDUCOU² confirme ces observations à propos du *Nectria*. ROULET³ poursuit des recherches sur le *Phycomyces* et les facteurs de croissance. BEIN⁴, sur le *Mucor hiemalis* et le *Rhizopus* *suinus*, étudie l'action de divers facteurs de croissance. PILET⁵ montre que l'*Endophyllum Sempervivi*, parasite du *Sempervivum tectorum*, cause des troubles importants dans la morphogénèse de la plante en favorisant une élévation du taux en auxines de l'hôte. BOUILLENNE et EVRARD⁶ étudient l'influence des substances hormonales sur le mycélium de l'*Agaricus Hortensis*.

b) Mesures. En employant nos techniques habituelles (PILET⁷) nous constatons (Fig. 2) que :

- 1° L'allongement des feuilles est moins rapide pour les organes parasités que pour les témoins;
- 2° La concentration en auxines dosables augmente très rapidement et atteint son maximum vers le vingtième jour de développement;
- 3° Les feuilles parasitées contiennent plus d'hormones que les feuilles normales (10^{-4} pour 10^{-6} Mol. ABIA).
- 4° La concentration en auxines paraît demeurer constante pour les feuilles malades, alors qu'elle diminue, dès le quarantième jour, pour les feuilles témoins.

¹ H. MARESQUELLE, Thèse Paris (1929).

² F. S. THATCHER, Amer. J. Bot. 26, 449 (1939).

³ A. L. GUYOT, Ann. Ecole agr. Grignon 2, 45 (1937) et 3, 58 (1938-1939).

⁴ Une partie des cultures a été entreprise au jardin botanique par M. MICHEL; les photographies qui accompagnent ce travail sont dues à M. VILLARET. Je remercie bien vivement ces trois collaborateurs.

⁵ K. V. THIMANN, J. Biol. Chem. 109, 279 (1935).

⁶ A. PH. WEBER, Thèse Paris (1936).

⁷ L. HAWKER, Ann. Bot. N. S. 2, 657 (1939).

⁸ G. DÉFAGO, Phytopathol. Z. 13, 293 (1940).

⁹ F. KÖGL et B. VERKAAIK, Z. Physiol. Chem. 280, 162 (1944).

¹ R. MORQUER et FR. NYSTERAKIS, Bull. Soc. Hist. nat. Toulouse 83 (1948).

² J. BERDUCOU, C. r. Acad. Sci. 231, 367 (1950).

³ M. A. ROULET, Exper. 7, 177 (1951).

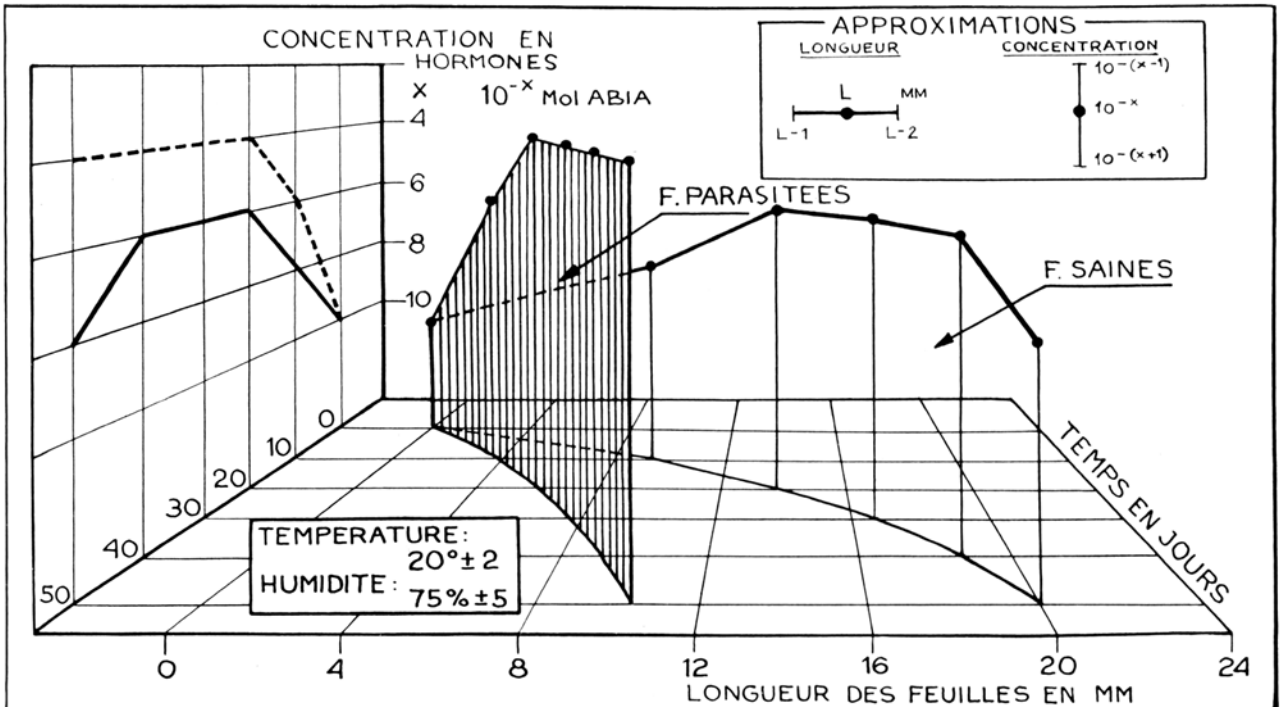
⁴ M. L. BEIN, Thèse Berne (1951).

⁵ P. E. PILET, Bull. Soc. bot. suisse 62, 269 (1952).

⁶ M. BOUILLENNE et L. EVRARD, C. r. Rech. C. Rech. Horm. 6, 127 (1952).

⁷ P. E. PILET, Bull. Soc. bot. suisse 60, 5 (1950); Mém. Soc. vaud. Sci. nat. 64, 137 (1951); Exper. 7, 262 (1951); Bull. Soc. vaud. Sci. nat. 65, 197 (1952); Phytion (Austria) 4, 247 (1953).

Fig. 2. (Voir texte.)



III. – Autres expériences

a) *Traitement auxinique.* Ajoutons au milieu de culture (1/3 de tourbe et 2/3 de sable) contenant des plantes saines et parasitées, une solution de b. indolylacétate de K (1 l par m²) à une concentration de 10⁻⁵ Mol. BIAK. Nous constatons (Fig. 3) que les plantes fortement parasitées se courbent vers le centre de la terre (de géotropiquement négatives, elles deviennent géotropiquement positives). Nous pouvons expliquer cette inversion en se rappelant que les tiges fortement parasitées contiennent déjà une grande concentration d'auxines

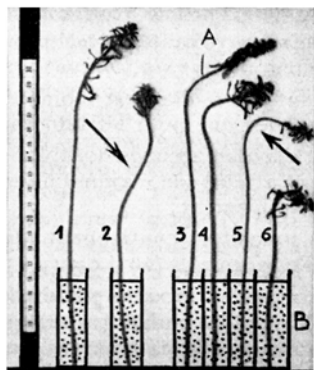


Fig. 3. A Plante; B Solution de b. indolylacétate de K à 10⁻⁵ Mol. BIAK. 1, 2... 5, 6 différents stades de parasitisme. Observations 4 jours après le traitement.

actives; un apport extérieur augmente encore la teneur en hormones (dose susoptimale) et ces tiges se comportent alors comme des racines (GEIGER-HUBER et HUBER¹, PILET²).

b) *Excitation lumineuse.* Soumettons un lot d'Euphorbes normales et parasitées à des radiations ultra-violettes (lampe de WOOD à 30 cm de la plante; longueur d'onde: 3600 Å ± 50). Nous constatons (Fig. 4) que:

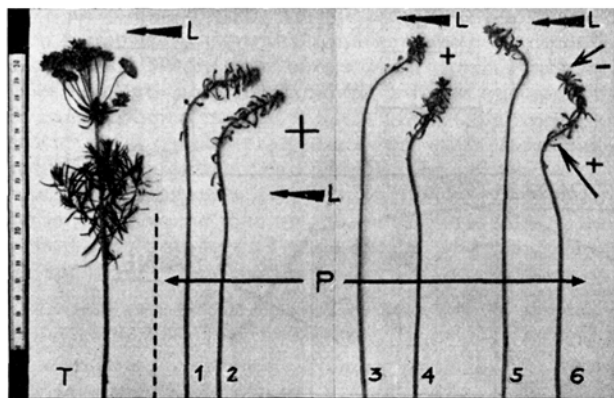


Fig. 4. T Témoin; P Parasitées; L Sens des radiations ultra-violettes. 1, 2... 5, 6 divers stades de parasitisme. Observations faites 18 h. après le début du traitement.

- 1° des plantes saines ne réagissent presque pas après 18 h de traitement;
- 2° des plantes faiblement parasitées présentent après le même temps un phototropisme positif;

¹ M. GEIGER-HUBER et H. HUBER, Exper. 1, 26 (1945).

² P. E. PILET, Act. Soc. helv. Sci. nat., Lausanne 129, 155 (1950); Bull. Soc. vaud. Sci. nat. 65, 197 (1952); 65, 409 (1953) – P. E. PILET et W. WURGLER, Bull. Soc. vaud. Sci. nat. 65, 317 (1953).

3° des plantes fortement parasitées présentent d'abord un phototropisme positif, puis deviennent négativement phototropiques.

Nous pouvons interpréter ce phénomène de la façon suivante: au début, la présence d'hormones entraîne une réaction positive, car les auxines détruites ou inactivées sur la face éclairée ne peuvent plus stimuler la croissance de cette face, alors que l'autre grandit davantage. Mais si la concentration des hormones augmente et devient susoptimale (de par la présence du parasite), la face dans l'ombre est alors inhibée et la face éclairée croît davantage, d'où courbure négative.

IV. – Discussion et résumé

Nous reprendrons les différents points de ce travail:

1° Les plantes de l'*Euphorbia Cyparissias* parasitées par l'*Uromyces Pisi* présentent un certain nombre de troubles morphologiques: tiges non ramifiées, plus longues, plus grêles et plus résistantes – feuilles plus courtes, plus larges, plus épaisses, jaune pâle, en forme de cuiller et tombant prématurément – castration florale.

2° L'allongement est moins rapide pour les feuilles parasitées que pour les autres.

3° Les feuilles parasitées sont plus riches en hormones et elles conservent plus longtemps cette concentration élevée que les feuilles saines qui, avec le temps, perdent une partie de leurs auxines.

4° Traitées par des auxines, les tiges malades deviennent géotropiquement positives; on peut interpréter cette inversion par une trop forte concentration (dose susoptimale) d'auxines due à la présence du champignon parasite.

5° Eclairées par des radiations ultra-violettes, les tiges parasitées présentent un phototropisme négatif, phénomène qu'on peut aussi expliquer par le taux élevé en hormones des plantes malades.

6° Mais un point déjà signalé (PILET¹) reste encore à résoudre. On peut se demander qu'elle est l'origine de cette production d'auxines dans la feuille. Plusieurs thèses doivent être envisagées:

- a) Le champignon fabrique des auxines qui augmentent la concentration en hormones des tissus parasités.
- b) La plante malade réagit en fabriquant des auxines en excès.
- c) Le parasite, en élaborant des corps spéciaux, assurerait l'activation de précurseurs d'auxines.

Ce problème ne sera vraisemblablement résolu que par l'étude biochimique du phénomène et grâce à la culture pure de l'*Uromyces*.

P. E. PILET

Institut de Botanique, Université de Lausanne, le 3 décembre 1952.

Summary

Leaves of *Euphorbia* parasitised with *Uromyces* are richer in hormones, and retain this high concentration longer, than the healthy leaves which gradually lose a part of their auxines. When treated with growth substances, the diseased pedicles become positively geotropic. This inversion may be explained by the presence of an excessive concentration of auxines due to the parasitic fungus. The same pedicles, after ultra-violet irradiation, show a negative phototropism, a phenomenon which might also be explained by the high level of hormones in the diseased plants.

¹ P. E. PILET, Bull. Soc. bot. suisse 62, 269 (1952).

The question still remains: what is the exact source of these auxines? Since a biochemical study of the phenomenon, which might be undertaken by means of a pure culture of uromyces, has as yet not been attempted, it is at present only possible to suggest a hypothesis: (a) that the fungus makes the auxines from which the level of the auxines in the parasitised tissues is augmented, or (b) that the diseased plant reacts by making an excess of auxines, or (c) that the parasite, by the formation of special bodies, causes the activation of the precursors of the auxines.

Comparative Antifibromatogenic Action of Progesterone and Δ^{11} -dehydroprogesterone

Among the different derivatives of progesterone with a double bond Δ^{11} -dehydroprogesterone offers a special interest. When first prepared (SHOPPEE and REICHSTEIN¹; HEGNER and REICHSTEIN²; VON EUW and REICHSTEIN³) it was found to be progestational; but due to the small quantities of the compound then available, no exact knowledge about its progestational potency was obtained. More recently the group of WETTSTEIN (MEYSTRE *et al.*⁴) were successful in preparing the Δ^{11} compound in larger quantities; the Δ^{11} compound was shown to be 3 times as progestational as progesterone in the rabbit test. Thus the Δ^{11} compound apparently is the most active "gestagen", to use MIESCHER's⁵ terminology.

Progesterone is known so far to be the most potent antifibromatogen (LIPSCHUTZ and VARGAS⁶; LIPSCHUTZ *et al.*⁷; LIPSCHUTZ⁸). However, antifibromatogenic potency is not concomitant with progestational potency; when the progestational potency of androgens is increased by substitutions at C₁₇ their antifibromatogenic potency does not increase correspondingly (LIPSCHUTZ⁹; LIPSCHUTZ *et al.*¹⁰; LIPSCHUTZ⁹). Compounds of more or less equal progestational potency may differ very considerably as to their antifibromatogenic potency as, for instance, methylidihydrotestosterone and ethinylandrostenediol (IGLESIAS *et al.*¹¹; see also MASSON and SELYE¹²). Thus it seemed of considerable interest to examine the following two questions: (1) will the Δ^{11} compound share with progesterone the faculty to prevent oestrogen-induced abdominal fibroids in the guinea-pig; and (2) will the antifibromatogenic potency of the Δ^{11} compound increase with the progestational one?

Experiments.—The results obtained with 30 castrated female guinea-pigs receiving simultaneously oestradiol and the Δ^{11} compound are summarized in the Table.

¹ C. W. SHOPPEE and T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **24**, 351 (1941).

² P. HEGNER and T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **26**, 715 (1953).

³ J. VON EUW and T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **29**, 654 (1946).

⁴ CH. MEYSTRE, E. TSCHOPP, and A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* **31**, 1463 (1948).

⁵ K. MIESCHER, *Rec. Progr. Horm. Res.* **3**, 47 (1948).

⁶ A. LIPSCHUTZ and L. VARGAS, *Endocrinology* **28**, 669 (1941).

⁷ A. LIPSCHUTZ, S. BRUZZONE, and F. FUENZALIDA, *Cancer Research* **4**, 179 (1944). — A. LIPSCHUTZ and M. MAASS, *Cancer Res.* **4**, 18 (1944).

⁸ A. LIPSCHUTZ, *Steroid Hormones and Tumors* (Williams & Wilkins, Baltimore, 1950), p. 133–135.

⁹ A. LIPSCHUTZ, *Exper.* **2**, 11 (1946).

¹⁰ A. LIPSCHUTZ, R. IGLESIAS, S. BRUZZONE, F. FUENZALIDA, and A. RIESCO, *Acta Unio Int. Cancer* **6**, 85 (1948).

¹¹ R. IGLESIAS, A. LIPSCHUTZ, and E. MARDONES, *Nature* (London) **167**, 235 (1951).

¹² G. MASSON and H. SELYE, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **84**, 46 (1945).

The Δ^{11} compound was absorbed from subcutaneously implanted pellets, or tablets, of 15 to 22 mg each; in experiments with smaller quantities half a tablet was used, or tablets containing 40% of the specific steroid and 60% of cholesterol. Absorption from mixed pellets was calculated on the assumption of non selective absorption; absorption per day was obtained by dividing loss of weight of the dried pellet by the number of days (for the errors implied see FUENZALIDA¹; FUENZALIDA and LIPSCHUTZ²). For greater details in the present experiment see the footnotes of the Table. Oestradiol was absorbed from pellets of 13 to 20 mg; absorption was of 28 to 72 μ g per day.

An experiment with 32 animals receiving progesterone has been used for comparison. Absorption of oestradiol was of 26 to 66 μ g per day. Two groups of older experiments with 24 animals receiving small quantities of progesterone (LIPSCHUTZ *et al.*³) were also added. The groups Progesterone-VI and VII are distant of no less than 10 years from one another; steroids of different chemical concerns have been used. However, results were fully coincident in these 2 groups: an antifibromatogenic effect was obtained with the small quantities of progesterone absorbed in these 2 groups. Results were not inferior to those in groups Progesterone-I, II, III, and V. The antifibromatogenic threshold quantity of progesterone was thus about 13 to 20 μ g.

With 1 pellet of the pure Δ^{11} compound as in group III an absorption of about 100 μ g per day was obtained, i.e. absorption rate was considerably smaller than with progesterone: 1.57 μ g of Δ^{11} per mm²/day, against 4.4 μ g of progesterone (the average for progesterone is 3.3; see FUENZALIDA¹; FUENZALIDA and LIPSCHUTZ²). The antifibromatogenic effect was identical with that of similar quantities of progesterone. With quantities of the Δ^{11} compound somewhat above the progesterone threshold as in group V, results with the Δ^{11} compound were less secure; there was 1 animal with tumours (see coefficient Q_{2-3}). The nodules "apical" were in this animal not of the common fibroid or desmoid type of oestrogen-induced abdominal tumours but leiomyomata of the mesosalpinx; they were similar to the leiomyoma pictured in Figure 16A in LIPSCHUTZ⁴ and included Wolffian tubules. The greater resistance of the oestrogen-induced leiomyoma against the Δ^{11} compound is of interest; so far uterine leiomyoma in women has not been made to diminish under the influence of progesterone (SEGALOFF *et al.*⁵).

With quantities beneath the progesterone threshold (group VIII) antifibromatogenic action was somewhat more pronounced with the Δ^{11} compound. However, much stress cannot be laid on this difference on account of the great variation of results in similar experiments; likewise, absorption figures are probably less exact with such small quantities than with larger quantities. Indeed, the difference between Δ^{11} -VIII and the control in IX was very considerable. But again, the tumoral effect in control groups is in general not so great as in the present case; an average of 4 to 5 is the rule.

Elsewhere we have attracted attention to the fact that even with a multiple of the threshold—about the 20-fold in our experiments with progesterone—inhibition of the

¹ F. FUENZALIDA, *J. Cl. Endocrinol.* **10**, 1511 (1950).

² F. FUENZALIDA and A. LIPSCHUTZ (in preparation, 1953).

³ A. LIPSCHUTZ, S. BRUZZONE, and F. FUENZALIDA, *Cancer Res.* **4**, 179 (1944). — A. LIPSCHUTZ and M. MAASS, *Cancer Res.* **4**, 18 (1944).

⁴ A. LIPSCHUTZ, *Steroid Hormones and Tumors* (Williams & Wilkins, Baltimore, 1950).

⁵ A. SEGALOFF, J. C. WEED, W. H. STERNBERG, and W. PARSON, *J. Cl. Endocrinol.* **9**, 1273 (1949).