

wirtschaftsdepartementes ermöglicht. Wir danken bestens für diese Unterstützung.

J.-P. CORNAZ und H. DEUEL

Agrikulturchemisches Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, den 1. Dezember 1953.

Résumé

Les acides hydroxamiques de deux échangeurs d'ions — sur base d'acide acrylique et sur base d'acide pectique — ont été préparés. Ils sont sélectifs pour Fe^{3+} .

Observation et étude quantitative de corpuscules d'aspect viral dans des cultures de sarcome de Rous

Depuis 1948, la mise en évidence du virus dans les cellules du sarcome de Rous a toujours été un de nos principaux objets de recherche. Nous avons été d'autant plus encouragés dans cette étude qu'au début nous avons vu quelques cellules dans lesquelles se trouvaient des grains très comparables à ceux figurés par CLAUDE, PORTER et PICKELS¹ et considérés par ces auteurs comme l'agent du sarcome². Par la suite, des images de cet ordre ne furent plus jamais retrouvées malgré un perfectionnement constant de notre technique, et dans des milliers de cellules parfaitement fixées le cytoplasme ne décelait aucun élément structural différent de ceux que l'on rencontre dans des macrophages spléniques d'un poulet normal. Les conclusions de ces recherches négatives ont été publiées dans un travail récent (BERNHARD et OBERLING³).

Pensant que le virus se trouve peut-être dans les cellules sarcomateuses sous forme masquée, c'est-à-dire non visible au microscope électronique, nous avons cherché à déterminer la production de virus corpusculaires par des procédés qui produisent l'induction de la lysogénie chez les microbes infectés d'une façon latente par un bactériophage. En nous basant sur les expériences bien connues à l'heure actuelle, de LWOFF⁴ et en nous inspirant d'une suggestion de LATARJET⁵, nous avons eu recours aux rayons X et à l'action d'isotopes radioactifs. Des fragments de sarcome de Rous ayant poussé sur des poulets âgés de 6 à 12 mois, des poussins de 12 à 15 jours, sur des membranes chorio-allantoïdes et dans le sac vitellin de l'œuf embryonnée, furent mis en culture sur Formvar, en goutte pendante, selon la technique indiquée par CLAUDE, PORTER et PICKELS.

24 h après la mise en culture, les cellules, en prolifération active, furent soumises à l'action des rayons X à des doses variant entre 300 et 1200 r. Dans une autre série d'expériences le milieu de culture fut additionné d'alcool radioactif ($\text{CH}_3\text{C}^{14}\text{H}_2\text{OH}$) à des doses de 0,25 à 2 microcuries par 100 cm³ de milieu de culture. Les cultures furent fixées aux vapeurs d'acide osmique 24 h après l'irradiation ou après 48 h de séjour dans le milieu radioactif. Après fixation les préparations furent lavées pendant 30 min à 1 h dans de l'eau distillée, décollées et montées sur treillis suivant la technique habituelle. L'examen des treillis fut effectué au microscope électronique Trüb-Täuber à 50 kV.

¹ A. CLAUDE, K. R. PORTER et E. G. PICKELS, Cancer Res. 7, 421 (1947).

² CH. OBERLING, W. BERNHARD, M. GUERIN et J. HAREL, Bull. Cancer 37, 2 (1950).

³ W. BERNHARD et CH. OBERLING, Bull. Cancer 40, N° 2 (1953).

⁴ A. LWOFF et A. GUTMANN, Ann. J. Pasteur 78, 711 (1950).

⁵ LATARJET, Communication personnelle.

On fut d'emblée frappé de voir dans certaines préparations un grand nombre de corpuscules sphériques assez osmiophiles, d'un diamètre d'environ 60 à 90 m μ . L'homogénéité de ces granules, tant au point de vue de leur densité que de leur dimension, est remarquable. Ces grains se trouvent en grande quantité disposés librement entre les cellules (Fig. 1) ou englobés dans des

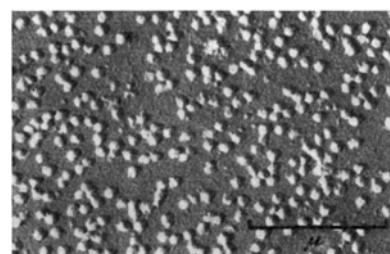


Fig. 1. Apparition de nombreuses particules extra-cellulaires entre 60 et 80 m μ de diamètre, éparses sans ordre entre les cellules. Culture de sarcome de Rous, traitée à l'alcool C¹⁴. Ombrage. Grossissement 18 000 \times .

débris cytoplasmiques de préparations dont les cellules ont manifestement souffert. Celles-ci présentent fréquemment des phénomènes de cytolysse avancée, peut-être dus à l'action des rayons X (Fig. 2). Dans des cas plus rares cependant, on voit des cellules encore relativement conservées, chargées de ces mêmes grains et réalisant des aspects absolument identiques à ceux décrits par CLAUDE, PORTER et PICKELS (Fig. 3). Il n'est pas toujours possible dans ces cas, d'exclure des phénomènes d'adsorption à la surface de la membrane cellulaire, et cependant la disposition des grains dans les débris cytoplasmiques suggère l'existence de rapports beaucoup plus étroits que ceux d'une simple adsorption. On voit en effet des flocons cytoplasmiques au sein desquels des grains semblent se dégager comme d'une matrice pour former des amas compacts de corpuscules

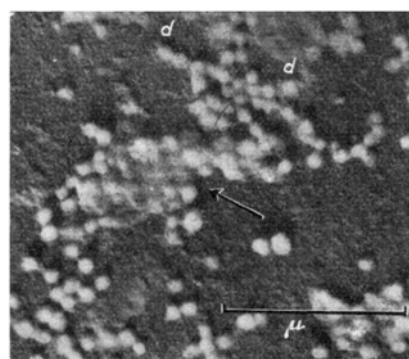


Fig. 2. Débris cytoplasmiques (d) avec des amas et des chaînettes de corpuscules d'aspect viral dans une culture de sarcome de Rous, traitée à l'alcool C¹⁴. La flèche → indique un fragment qui semble se transformer entièrement en corpuscules. Préparation ombrée. Grossissement 24 000 \times .

rangés géométriquement en quinconce (Fig. 2 et 4). Ces amas se dispersent ensuite en granulations isolées ou groupées en courtes chaînettes. Dans un très petit nombre de cas ces mêmes faits s'observent à l'intérieur des cellules où les amas de grains peuvent prendre des aspects très réguliers, tout à fait comparables à des corps d'inclusions (Fig. 5).

Etant donné l'abondance des grains dans certaines de nos préparations, nous avons pensé au début qu'il s'agissait effectivement d'un phénomène analogue à celui d'une induction lysogénique. Nous fûmes frappés, cependant, par le nombre relativement faible de *cultures* dans lesquelles ce phénomène fut observé (26 sur 272 soit 9,5%); en établissant la proportion de *cellules* porteuses de grains par rapport à celles qui en sont indemnes, on constate que 25 cellules seulement contiennent des grains pour 6600 cellules irradiées qui en sont dépourvues (soit 0,38%). Comme contrôle nous avons examiné 3800 cellules de sarcome de Rous non irradiées dans lesquelles 5 cellules se sont trouvées porteuses de grains (soit 0,13%). Enfin, des macrophages de rate de poulet embryonnaire ont été soumis au même traitement, et sur 104 cultures avec un nombre total de 1735 cellules, on a trouvé dans une seule région extra-cellulaire très limitée, quelques granules apparemment identiques à ceux précédemment décrits.

Les grains que nous venons d'observer sont identiques à ceux figurés par CLAUDE, PORTER et PICKELS. C'est la première fois que nous avons retrouvé exactement les mêmes images que celles reproduites par les auteurs précités, fait qui, à notre connaissance, n'a été signalé jusqu'ici dans aucun travail. Quant à la question de savoir s'il s'agit de l'agent causal du sarcome de Rous, nous ne pouvons que répéter les arguments avancés par les auteurs américains. Il faut insister cependant sur cette notion élémentaire, que l'identification morphologique d'un virus comme d'un microbe n'est pas infaillible, et l'on peut, exceptionnellement, voir des éléments identiques dans des tissus normaux comme le montre une de

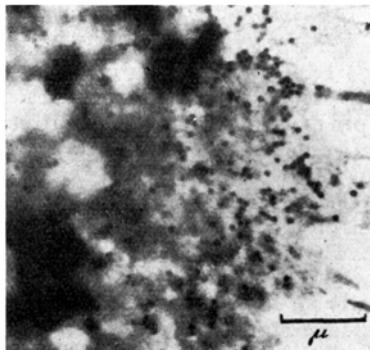


Fig. 3. Autre cellule de la préparation précédente. Cytoplasme périphérique rempli par ces mêmes corpuscules groupés ici en amas et en courtes chaînettes.
Grossissement 11 000 x.

nos préparations. Nous retrouvons ici le même phénomène décrit par HAREL et VIGIER dans leur étude sur le virus de l'érythroblastose aviaire, d'où il ressort d'une façon évidente que des grains morphologiquement identiques au virus peuvent se trouver dans le plasma normal, mais en nombre infiniment moins élevé¹.

D'autre part, malgré le chiffre plus élevé de cas positifs après irradiation, nous ne sommes pas convaincus que celle-ci ait sensiblement favorisé l'apparition de grains par suite d'une action inductrice. Il est bien possible, en effet, qu'ayant à faire à des cellules irradiées, notre attention ait été tout particulièrement portée vers les cellules endommagées alors que dans les examens antérieurs nous avons toujours eu comme principe d'examiner uniquement les cellules parfaitement con-

servées à chondriocontes en très bon état, et que nous avons toujours cherché à obtenir une pureté parfaite des préparations en éliminant tous les éléments cytolysés. Il est possible aussi que l'âge moyen des animaux, nettement inférieur à celui des poulets de nos expériences antérieures et l'emploi fréquent de tissus sarcomateux provenant de cultures dans l'œuf, déjà utilisées par CLAUDE et coll., ait contribué à fournir des cellules sarcomateuses riches en virus corpusculaires. La filtrabilité de ces tumeurs à croissance rapide et très myxomateuse a toujours été très élevée, mais pas plus que dans nos expériences précédentes qui ne nous ont pas permis de voir des corpuscules virus. Leurs extraits acellulaires, obtenus par ultra-centrifugation et testés sur la membrane chorioallantoïdienne d'embryons étaient cependant actifs dans pratiquement tous les cas à la dilution de 10⁻⁷.

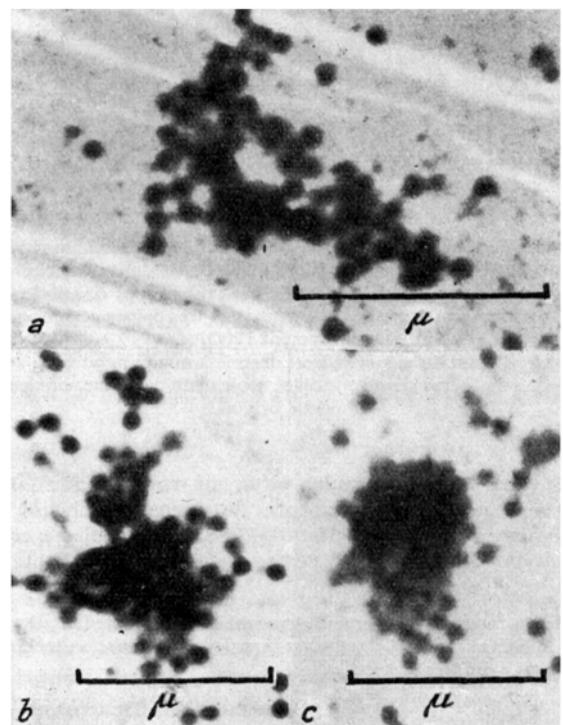


Fig. 4a-c. Colonies isolées de corpuscules retrouvés entre les cellules lysées d'un sarcome de Rous; leur disposition évoque celle de staphylococques en croissance. Dans la Figure c les éléments sont disposés en quinconce. Les Figures a et c proviennent de préparations non irradiées, Figure b d'une culture irradiée aux rayons X à 600 r. Grossissement entre 25 000 et 35 000 x.

Quoiqu'il en soit, nous croyons que l'utilisation de tumeurs très actives provenant d'animaux jeunes et l'examen de cellules en voie d'histolyse, que nous avions toujours l'habitude d'écartier lors de nos examens antérieurs par des lavages intempestifs, ont favorisé la mise en évidence d'un virus dans les cellules du sarcome de Rous. Quant au rôle de l'irradiation, il ne nous paraît pas nettement établi. Nous espérons qu'il ressortira d'une façon plus nette d'expériences actuellement en cours.

Comme résultats nouveaux de ces recherches nous retiendrons:

1° Que dans le sarcome de Rous, il y a des corpuscules d'aspect viral, visibles au microscope électronique, mais dans un pourcentage très réduit de cellules. Ceci est

¹ J. HAREL et PH. VIGIER, Bull. Cancer 40, n° 2 (1953).

en accord parfait avec les calculs établis par CARR¹ sur des bases toutes différentes.

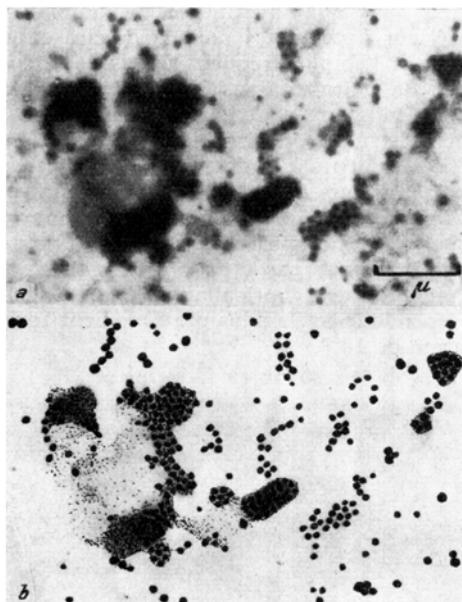


Fig. 5a. Portion cytoplasmique d'une cellule sarcomateuse traitée à l'alcool C¹⁴. Présence de nombreuses colonies de corpuscules dont quelques-unes prennent l'aspect de véritables corps d'inclusion qui paraissent se constituer à partir de masses très denses et homogènes.

Grossissement 11 000 ×.

Fig. 5b. Dessin du même endroit destiné à mieux montrer la structure fine des corps denses, visibles seulement par transparence sur le cliché original.

^{2°} Que les corpuscules-virus en voie de formation peuvent prendre l'apparence de corps d'inclusion ou d'ébauches de figures cristalloïdes, comparables à celles mises en évidence par WYCKOFF² dans certains bactériophages et autres virus.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à Mme LISE DUGIED et à Mme HENRIETTE GOARÉGUER pour leur collaboration technique qui nous a été très précieuse.

CH. OBERLING, W. BERNHARD,
Mme A. DONTCHEFF et P. VIGIER

Institut de Recherches sur le Cancer, Villejuif (Seine), France, le 11 août 1953.

Zusammenfassung

In vitro gezüchtete Zellen des Rous'schen Sarkoms wurden der Wirkung von Röntgenstrahlen und radioaktivem Alkohol ($\text{CH}_3\text{C}^{14}\text{H}_2\text{OH}$) ausgesetzt und darauf elektronenoptisch untersucht. In einem geringen Prozentsatz der untersuchten Kulturen (9,5%) konnten virusartige Partikelchen von 60 bis 90 m μ Durchmesser intra- oder extrazellulär dargestellt werden, die mit den von CLAUDE, PORTER und PICKELS gefundenen identisch sind und wahrscheinlich dem Rousschen Virus zugeordnet werden können. Es wurden Kolonien von solchen Gebilden intrazytoplasmatisch in Form von Einschlussskörperchen beobachtet. Auch unbestrahlte Kontrollen

von Sarkomzellen wiesen Viruskörperchen auf, wenn auch bisher in geringerem Prozentsatz.

Es ist vorderhand noch unsicher, ob der Bestrahlung eine primäre Rolle in der Darstellbarkeit dieser Viren zukommt.

Metabolic Effects of Neopyrithiamine and the Aneurin Contents in the Tissues of the Rat

In earlier researches¹ on the metabolic alterations produced in the rat treated with Neopyrithiamine (N.P.), we observed an increase in the blood pyruvate, decrease of the R.Q. and a decrease in the energetic metabolism (H.P.) of the same entity as demonstrated by rats on an aneurin-deprived diet (3–4 weeks); a more marked diminution of muscular glycogen, and a more rapid onset of muscular fatigue in the isolated muscle (diaphragm) in contrast to the rats on a vitamin deprived diet. After administration of glucose (1 g) *per os*, we noted no increase of the H.P. and R.Q., contrary to what is observed in the control rats and in the rats on an aneurin-deprived diet (3–4 weeks²). From these results we concluded that the avitaminosis B₁ produced in a short time by the action of antivitamin B₁ (N.P.) was more marked than that which is obtained after 3–4 weeks of an aneurin-deprived diet. Particularly interesting to us was the lack of a change in the H.P. and R.Q. after the administration of glucose and, since the observation was based on only two experiments due to the small quantity of N.P. at our disposal, we thought it proper to repeat it, as soon as we received a further quantity of N.P., kindly put at our disposal by Merck House (New York³).

On other 3 groups (2 animals in each group; white rats, 75–85 g) treated with endoperitoneal injection of N.P. (5 mg *pro die* for 5–6 days consecutively), we confirmed what we had previously observed that after introduction of glucose the R.Q. and especially the H.P. remain practically unchanged, which shows the lack of utilization of the glucides, under the action of the antivitamin. The R.Q. and H.P. were determined on groups of two animals each kept under a glass bell of known capacity for 10'. The samples of air were analyzed with the Haldane-Margaria apparatus. The glucose (1 g in 1 ml of water) was administered by sound. The determinations were made after 40–60 min. The results are shown in Table I. The fact that the non-utilization of the glucides is due entirely or in part to an altered mechanism of intestinal absorption was not taken into consideration in the present researches.

To explain the different behaviour obtained with N.P., we thought it expedient to determine the contents of the total aneurin in the tissues (thiochrome method⁴ with adsorption on Decalso and elution with acid KCl), considering it to be a reasonable supposition that the gravity of the avitaminosis must be preceded to an equal extent by loss of vitamin in the tissues.

We have taken into consideration (as shown by SEALOCK and WHITE⁵) an interference of the thiochrome

¹ L. DE CARO and G. RINDI, Boll. Soc. Ital. Biol. sperim. 28, 1869 (1952).

² L. DE CARO, C. CASELLA, and G. RINDI, Exper. 8, 431 (1952).

³ We particularly thank Dr. K. FOLKERS for his kind and frequent offers of samples of Neopyrithiamine.

⁴ Association of Vitamine Chemists, Inc., *Methods of Vitamin Assay*, 2nd Ed. (Interscience Publishers, New York, 1951), p. 111.

⁵ R. R. SEALOCK and H. S. WHITE, J. Biol. Chem. 181, 393 (1949).

¹ J. G. CARR, Proc. Roy. Soc. (Edinburgh [B] 62, 247 [1947]).

² R. W. G. WYCKOFF, Presse médicale 58, n° 82, 25 décembre 1950. Article dans «Science in Progress» [7], Ed. Baitsell, Yale University Press 1952.