

des membranes traitées: elles étaient prélevées 1 h, 24 h et 48 h après l'inoculation. L'activité enzymatique a été exprimée en γ de phosphore libéré à 38°C en 15 min, par 10 γ d'azote protéique des microsomes. Le phosphore a été dosé par la méthode de KUTTNER¹ et l'azote par la méthode de KJELDAHL, après minéralisation. Les membranes utilisées comme témoins ont été inoculées avec un même volume de la solution de saccharose seule.

Contrairement à notre attente, la glucose-6-phosphatase s'est montrée présente en faible quantité dans les microsomes de la membrane chorioallantoïdienne normale. Son activité diminue d'ailleurs fortement au cours du développement embryonnaire. Si on attribue une valeur de 100 % à l'embryon de 10 jours, l'activité tombe à 30-37 % après 11 jours et à 6-10 % après 12 à 13 jours.

Pour obtenir une mesure de l'activité enzymatique attribuable aux microsomes inoculés seulement, nous avons déduit de l'activité de la membrane traitée avec la suspension de microsomes la valeur trouvée pour la membrane témoin traitée en même temps. Voici l'essentiel des résultats obtenus:

- 1° L'activité enzymatique des microsomes diminue fortement au cours des 24 h qui suivent l'inoculation.
- 2° Dans cinq expériences sur six, l'activité de la phosphatase s'est montrée de deux à six fois plus élevée après 48 h qu'après 24. Dans le sixième cas, elle a continué à diminuer.
- 3° Une suspension de microsomes du foie, incubée stérilement à 38°C en tube à essai, perd la quasi-totalité de son activité phosphatasique en 48 h. L'autolyse ne provoque donc pas de libération de l'enzyme.
- 4° Une suspension de microsomes du foie portée à 80°C pendant 5 min perd son activité enzymatique et se montre incapable d'enrayer la chute de l'activité glucose-6-phosphatasique de la membrane chorioallantoïdienne. De même, quoi qu'elle soit capable d'activer la prolifération cellulaire de la membrane chorioallantoïdienne², une suspension de *Tetrahymena geléii*, tués par chauffage à 50°C, est sans effet sur l'activité phosphatasique des microsomes de la membrane (Tableau).

| Nature de l'inoculum | Activités enzymat. en γ P/10 γ N | | |
|---|--|-------|----------------|
| | 1 h | 24 h | 48 h |
| Microsomes du foie d'embryons de poulet . . . | 0,16 | 0,15 | 0,32 0,37 |
| | 0,16 | 0,04 | 0,08 |
| | 0,75 | 0,11 | 0,34 |
| Microsomes du foie chauffés à 80°C | — | 0,13 | 0,78 |
| | 0,008 | 0,009 | — |
| | — | — | 0,030 0,034 |
| Suspension de <i>Tetrahymena</i> | — | — | — |
| | — | — | 0,048 0,082 |
| Témoin: solution de CHAMBERS. . | — | — | — |

Notons encore que les granules du foie perdent 75 % de leur glucose-6-phosphatase si on les laisse à 37°C pendant 1 h. Il est probable qu'une inactivation compa-

rable se produise lorsque les microsomes sont déposés sur la membrane: la faible activité que l'on retrouve après 1 h d'incubation témoigne sans doute d'une «dilution» des microsomes du foie, actifs, par ceux de la membrane qui le sont beaucoup moins. La diminution de l'activité se prolonge jusqu'à 24 h environ, et elle atteint alors de 93 à 97 %; la perte observée lors de l'autolyse d'une suspension de microsomes est de 96 % à ce moment-là.

L'augmentation d'activité de la phosphatase des microsomes de la membrane après 48 h est compatible avec une multiplication des particules inoculées à l'intérieur des cellules de la membrane.

En effet, la stimulation de la croissance de la membrane par un matériel dépourvu d'activité enzymatique ne suffit pas à provoquer la synthèse de la glucose-6-phosphatase dans les microsomes.

Les résultats acquis plaident donc en faveur de l'hypothèse d'une multiplication des microsomes au sein des cellules de la membrane chorioallantoïdienne; l'étude d'autres enzymes constitutifs des microsomes du foie nous paraît cependant indispensable avant qu'on ne puisse considérer cette hypothèse comme démontrée.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à M. A. LWOFF, qui a obligeamment mis à notre disposition la souche de *Tetrahymena geléii* utilisée dans ce travail.

Mlle J. LE CLERC

Laboratoire de morphologie animale, Faculté des sciences de l'Université libre de Bruxelles, le 20 février 1954.

Summary

In order to test the possibility for microsomes to multiply like viruses, microsomes of chick liver were inoculated on chorioallantoic membranes. The glucose-6-phosphatase activity, an enzyme located in the liver microsomes, was determined in the treated membranes. The activity decreased during the first 24 h after inoculation. It reached, after 48 h, from two to six times the value attained after 24 h.

A suspension of heated granules, or of heated *Tetrahymena geléii*, though producing the same lesions of the membrane, did not increase the phosphatase activity of the microsome fraction after 48 h.

The present results are compatible with the idea that liver microsomes multiply by autoduplication.

L'absorption du facteur «L.E.» par des noyaux cellulaires isolés

Nous savons que le sérum de patients atteints de lupus érythémateux disséminé aigu peut contenir un facteur qui, mis en contact avec des leucocytes, provoque des altérations caractéristiques de ces cellules. Ces altérations consistent en une nucréolyse intracellulaire, en phagocytoses de corps nucléaires par des leucocytes polynucléaires surtout et en rosettes de leucocytes disposés autour des masses nucléaires. Il est possible que le facteur responsable de ce phénomène, appelé «L.E.» ou lupus érythémateux, soit une globuline ayant les caractères d'un anticorps antinoyaux. Un sérum anti-noyau humain, mis en contact avec des leucocytes humains, provoque en effet des altérations semblables à celles du phénomène L.E.¹.

¹ T. KUTTNER et COHEN, J. B. C. 75, 517 (1937).
² R. A. FENNEL, J. Elisha Mitchell Soc. 67, 219 (1951).

¹ P. MIESCHER, M. FAUCONNET et TH. BÉRAUD, J. Exp. Med. Surg. 11, 173 (1953).

Nous savons qu'un anticorps peut être absorbé par l'antigène correspondant. Dans cet exposé, nous étudions la question de savoir si le facteur L.E. peut être absorbé par des noyaux cellulaires isolés, ces derniers étant considérés comme l'antigène dans le phénomène L.E.

Récemment, nous avons observé dans notre service deux patients présentant un phénomène L.E. indirect positif. Profitant de l'occasion, nous avons fait avec le sérum de ces deux patients le «test d'absorption au moyen de noyaux cellulaires isolés».

Méthode (d'après MIRSKY et POLLISTER¹), BRAUNSTEINER et coll.², POTTER et ELVEHJEM³ et SCHNEIDER et coll.⁴.

Pour absorber 2 cm³ de sérum contenant le facteur L.E., nous employons les noyaux de leucocytes isolés de 30 cm³ de sang citraté provenant d'un patient atteint d'une leucémie à myéloblastes (70 000/mm³). Nous ajoutons au sang 1/5e de Subtosan «Specia» (3,5% polyvinyl pyrrolidone) pour faire sédimentier les globules rouges, tout en laissant en suspension les globules blancs. Ce mélange est incubé à 37°C pendant 1 h en tube incliné. Ces leucocytes sont isolés par centrifugation du plasma surnageant. La suite des opérations se fait à une température de 0°C. Le culot leucocytaire est mis en suspension dans 8 cm³ d'une solution à 1 M. de saccharose et à 0,2% d'acide citrique. L'acide citrique empêchera l'auto-fermentation des leucocytes lésés lors du procédé suivant. Cette suspension est «pottérisée» pendant 2 min, toujours à une température de 0°C, puis lavée dans 20 cm³ de la solution de saccharose à 0,2% d'acide citrique. Centrifugation pendant 10 min à 1600 tours par minute dans une centrifuge réfrigérée à 0°C. – Dans l'appareil de POTTER, les leucocytes sont traumatisés. Le cytoplasme est détaché des noyaux. La centrifugation sépare ensuite les fragments de cytoplasme des noyaux du fait que le poids spécifique des noyaux est plus grand que celui du cytoplasme. – Le culot cellulaire est de nouveau mis en suspension dans 8 cm³ de la solution de saccharose, «pottérisé» pendant 2 min, puis lavé dans 20 cm³ de la solution de saccharose. Centrifugation comme avant. La même manipulation recommande. Après la 3^e «pottérisation», les noyaux sont lavés 4 fois pour enlever les derniers restes de cytoplasme. Contrôle microscopique du résultat obtenu. Dans le tube, contenant le culot des noyaux, on enlève la dernière trace de solution avec un tampon d'ouate. Les noyaux sont ensuite bien suspendus dans 2 cm³ du sérum à examiner. Le reste de ce sérum est gardé pour les contrôles. Le sérum contenant les noyaux isolés est incubé à 4°C pendant 18 h, puis centrifugé pour en éliminer de nouveau les noyaux. Avec le sérum ainsi traité et avec le sérum non absorbé, nous faisons le test L.E. indirect d'après la méthode de WEISBERGER et coll.⁵. Les mêmes leucocytes humains normaux sont ainsi mis en contact en même temps avec le sérum non absorbé et le sérum absorbé.

Le sérum des deux patients a perdu les propriétés spécifiques par l'absorption au moyen de noyaux cellulaires isolés. Le phénomène L.E. a été positif avec le sérum non absorbé et négatif avec le sérum absorbé (Tab. I). Déjà

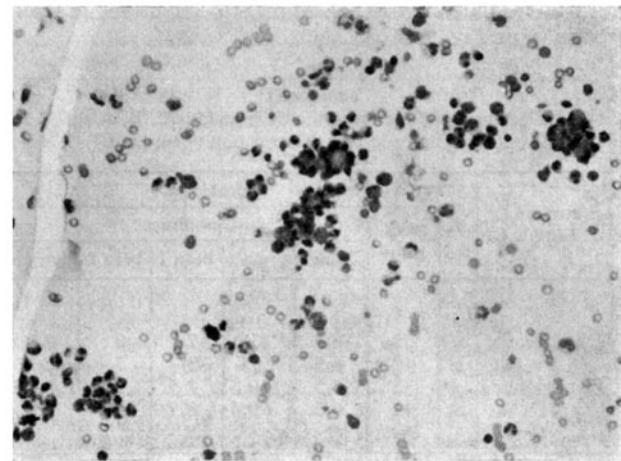


Fig. 1. Test L.E. fait avec le sérum non absorbé de la malade E.B.

Tableau I
Résultat du test d'absorption au moyen de noyaux cellulaires isolés

| Sérum du patient | * | Test L.E. indirect | | |
|------------------------------|---|--|------------------|-------------------------|
| | | Homogénéisa- tion des noyaux polynucléaires (en % de leucocytes) | Cellules L.E. | Formes en rosette |
| MARCEL G. | A | 11% | + | ++ |
| | B | 4% | - | - |
| EDITH B. Premier examen . | A | 5% | + | ++ |
| | B | 1% | - | - |
| EDITH B. Second examen . | A | 4% | ++ | ++ |
| | B | 1% | - | - |

* A sérum non absorbé; B sérum absorbé.

+ formes trouvées isolées sur le frottis.

++ nombreuses formes réparties sur tout le frottis.

au faible grossissement, la différence est évidente: avec le sérum non traité les leucocytes sont disposés en amas et en rosettes autour des masses nucléaires. Avec le sérum

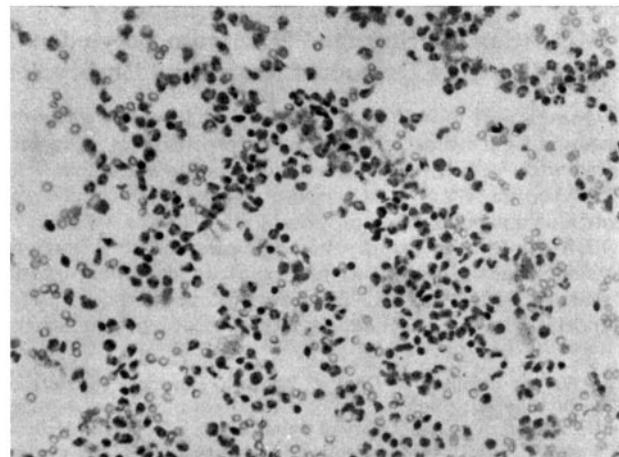


Fig. 2. Test L.E. fait avec le sérum (de la malade E.B.) absorbé par des noyaux cellulaires isolés

¹ A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, J. General Phys. 30, 117 (1946).

² H. BRAUSTEINER, F. PAKESCH et H. VETTER, Acta Haemat. 8, 304 (1952).

³ V. R. POTTER et C. A. ELVEHJEM, J. Biol. Chem. 114, 405 (1936).

⁴ SCHNEIDER et coll., cit. d'après CH. DE DUVE, Expos. ann. Biochimie méd. 14, 47 (1952).

⁵ G. WEISBERGER, C. MEACHAM et R. W. HEINLE, J. Labor. clin. Med. 39, 480 (1952).

absorbé les leucocytes sont disposés régulièrement sur le frottis (voir Fig. 1 et 2).

Tableau II

Examen électrophorétique du sérum de la malade E. B. avant (* Sérum A) et après le test d'absorption (* sérum B)

| Sérum de la patiente E.B. | * | % protéines | | | | | |
|---------------------------|---|-------------|------------|---------|--------|--------|-------|
| | | Albu-mine | Globulines | | | | |
| | | | alpha 1 | alpha 2 | béta 1 | béta 2 | gamma |
| Expérience I | A | 38 | 6 | 11 | 7 | 6 | 32 |
| | B | 42,5 | 6,5 | 9,5 | 8 | 7 | 26,5 |
| Expérience II | A | 38 | 5,5 | 10,5 | 7,5 | 7 | 31,5 |
| | B | 41 | 6,5 | 9,5 | 8,5 | 9,5 | 25 |

L'étude électrophorétique (électrophorèse sur papier «Elphor»), faite avant et après le test d'absorption, a mis en évidence une diminution nette des gamma-globulines et une diminution peu marquée des alpha-2-globulines (voir Tabl. II).

Nous pouvons conclure de ces résultats que le facteur responsable du phénomène L.E. peut être absorbé par des noyaux cellulaires isolés. Ceci parle en faveur de l'hypothèse que le facteur L.E. est une substance ayant un caractère d'anticorps antinoyaux, sans que l'on puisse exclure avec certitude la possibilité que ce facteur soit un enzyme perdant son activité après avoir agi sur des noyaux.

P. MIESCHER et M. FAUCONNET

Clinique Médicale Universitaire, Lausanne, le 30 janvier 1954.

Summary

The serum containing the L.E. factor loses its activity after having been put in contact with isolated cell nuclei. The electrophoretic examination shows a clear diminution of the gamma globulin and a slight diminution of the globulin alpha 2. That the factor responsible for the L.E. phenomenon can be absorbed by isolated cell nuclei is an argument in favor of the hypothesis that this factor is a substance having the character of an anti-nuclear anti-body, without one being able to exclude with certitude the possibility that this factor is an enzyme.

Migration of "Storage PNA" from Cotyledon into Growing Organs of Bean Seed Embryo¹

OSAWA and OOTA² have shown that in every growing organs of germinating bean embryo protein is accumulated with simultaneous increase in pentose nucleic acid (PNA) content, and that the reserve organ, the cotyledon, contains a remarkable amount of PNA ("storage PNA") which diminishes rapidly in the course of germination. It seems reasonable to assume that at least part of the "storage PNA" which disappears is recovered in PNA deposited in the anabolic organs. A problem arises here

concerning the migrating form of PNA in the embryonic tissues, i.e. whether "storage PNA" is transported as such from the cotyledon into the growing tissues, or as fragments after being decomposed. In other words, whether the increase in PNA content in the latter means simple accumulation of intact PNA molecules transported as such, or resynthesis of PNA from the decomposed fragments in the tissues in question.

Considering the probable relationship between PNA accumulation and protein synthesis, this problem is thought to be worth while pursuing. We have, therefore, conducted preliminary investigations on the behaviour of "storage PNA" in germinating *Vigna sesquipedalis* seeds, and obtained some results which will be reported below.

Firstly, we studied whether the presence of the anabolic organs attached to the cotyledon is an indispensable condition for the disappearance of "storage PNA". Pre-soaked (for 6 h at 35°C) bean seeds were sterilized with 70% alcohol, decoated, and divided into two cotyledon segments under aseptic conditions: one with seedling portion attached and the other without any other organ. These two lots of material were laid spherical side down on separate moist filter papers. After 48 h of aseptic incubation in the dark at 30°C, when the attached seedlings were about 8 cm long, both lots of cotyledons were analyzed for PNA-phosphorus (PNA-P) content, the seedling portions being discarded. Prior to incubation, an aliquot of isolated cotyledon segments was used for estimation of the initial PNA-P content. General methods of fractionation and analysis used were essentially the same as has been described elsewhere². The results are shown in Table I.

Table I.—Change in PNA-P content of bean cotyledon with and without attached seedling

| Material | Cotyledon without seedling | | Cotyledon with seedling | |
|----------------------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| | Incubation period (hours) | PNA-P (μg/cotyledon segment) | Incubation period (hours) | PNA-P (μg/cotyledon segment) |
| Incubation period (hours) . . | 0 | 48 | 0 | 48 |
| PNA-P (μg/cotyledon segment) . . | 31.9 | 31.3 | 31.9 | 16.8 |

In cotyledons bearing no seedling portion, PNA-P content is found to be retained almost at the initial level during the incubation period, while in cotyledons with seedling portion attached, it is remarkably diminished. That is to say, even with a good water supply, the cotyledon *per se*, i.e. without the seedling portion attached, hardly shows hydrolytic action on PNA. The following explanation may be tentatively given: some factor accelerating the hydrolysis of PNA may be delivered to the cotyledon from the seedling, and/or rapid establishment of equilibrium in the hydrolytic reaction in the cotyledon may be hindered by the removal of reaction products by the growing tissues attached. A further possibility should not be overlooked here that "storage PNA" in the cotyledon migrates as such, without decomposition, into the seedling tissues.

Secondly, the time course of change in contents of total-, acid-soluble-, and PNA-P of both seedling and cotyledons were investigated. Pre-soaked seeds were set out in moist sand placed in porcelain pots, and germinated in the dark at 30°C. The sprouts were harvested at desired stages covering 4 days of cultivation. As the 0-day-old material, pre-soaked seeds were employed. The results obtained are shown in Table II.

¹ We are indebted to Dr. Ch. KOYAMA, Chemical Institute of Nagoya University, for the use of a Lauritsen apparatus, and also to Dr. A. SIBATANI, Laboratory of Cytochemistry, Yamaguti Medical School, for his valuable suggestions during this work. P³² used in this experiment was provided by Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, U.S.A.

² S. OSAWA and Y. OOTA, Exper. 9, 96 (1953).