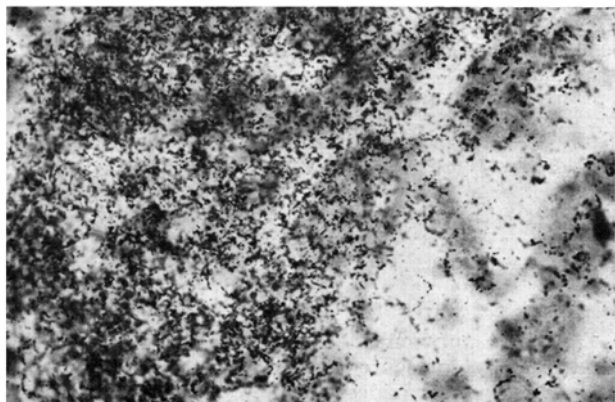


Le cas des coupes de tissu («slices») retiendra plus particulièrement notre attention.



On voit à gauche le bord de la coupe, très actif; à droite, assimilation très réduite.

DEANE *et al.*³ ont montré, par des méthodes histo-chimiques, que la glycogénèse hépatique est restreinte à un ruban cellulaire situé à la périphérie de la tranche, large de 8 à 12 cellules, dans le cas des coupes de tissus.

La méthode autoradiographique mise au point par FICQ *et al.*⁴ nous a semblé susceptible de servir utilement à une étude de cette question, en ce qui concerne l'incorporation des acides aminés marqués. Nous avons prélevé des cylindres de tissu hépatique par ponction à l'aide de l'aiguille de P. IVERSEN, dont le diamètre intérieur est de 1 mm; la longueur de ces cylindres est de 8 à 10 mm. Ils sont plongés aussitôt dans du milieu de KREBS contenant 0,36 mg de glycine-1-C 14 par cm³ (radio-activité de 16 μ C), maintenu à 38° et oxygéné. Après 60 min, ils sont sortis du milieu et lavés avec une solution de glycine non radio-active, puis fixés à l'alcool acétique, enrobés et coupés à 5 μ . Les autoradiographies et la coloration au vert de méthyl-pyronine ont été effectuées suivant la technique décrite par FICQ, GAVOSTO et ERRERA⁴.

La méthode histo-chimique de détection des acides nucléiques par la coloration au vert de méthyl-pyronine permet immédiatement de se rendre compte de la disparition des blocs de BERG au niveau des cellules intérieures; seul, un ruban cellulaire large de 3 à 5 cellules, situé à la périphérie de la coupe, présente encore la basophilie caractéristique de l'acide ribonucléique.

Cette disparition, dans les cellules internes, est à mettre en rapport avec l'anoxie tissulaire (DROCHMANS⁵). Rappelons en effet, que l'épaisseur maximale d'une tranche tissulaire pour les mesures des échanges respiratoires, répond à la formule établie par WARDBURG⁶:

$$d' = \sqrt{8 C_0 \frac{D}{A}}$$

dans laquelle C_0 est la concentration en oxygène à la surface de la coupe, A l'activité respiratoire du tissu, D la constante de diffusion de l'oxygène dans le tissu et d' , l'épaisseur de la coupe telle que la concentration en oxygène au centre de la coupe est égale à zéro. On peut atteindre une concentration au centre de la coupe égale

à 0,6 atmosphère en remplaçant l'air par de l'oxygène pur. Mais jamais la coupe, quand il s'agit du foie, ne peut excéder 0,3 mm.

C'est cette anoxie qui explique également que les traces d'électrons sont limitées aux cellules extérieures du cylindre tissulaire (voir Figure); l'assimilation de la glycine n'a lieu qu'au niveau des cellules bien oxygénées; en effet, nous savons que si l'on bloque la respiration cellulaire, il n'y a plus de formation de liaisons peptidiques (BOROOK *et al.*², REINER⁷).

Conclusions. Les résultats obtenus par l'emploi de coupes tissulaires dans l'étude des phénomènes métaboliques ne sont valables que qualitativement. L'épaisseur de la tranche de tissu ne doit jamais excéder 0,3 mm. L'examen de préparations autoradiographiques de foie incubé avec de la glycine marquée nous a montré que l'incorporation est localisée aux cellules périphériques de la coupe.

F. MOYSON

Laboratoire de morphologie animale, Université libre de Bruxelles, le 11 octobre 1955.

Summary

The use of tissues slices for metabolic studies gives results valuable only from the qualitative view-point. The histochemistry of liver slices reveals indeed that there is a disappearance of the basophilia of the inner layers of cells and, consequently, autoradiographic preparations of slices incubated with tagged glycine show that the incorporation of the amino-acid is limited to the outer layers of cells.

⁷ REINER, Fed. Proc. 8, 176 (1949).

Quantitative Changes of the Free Phospholipids in the Sea-Urchin Egg at Fertilization

MAGGIO and MONROY¹ have recently put forth the working hypothesis that in the sea-urchin egg upon fertilization a release of phospholipids occurs which would then be broken down first to lysophosphatides and finally to water-soluble products, probably glyceryl-phosphoryl-choline. This hypothesis rested on the evidence obtained from the study of the reactions taking place in a model system consisting of living sea-urchin sperm and a lipoprotein. It appeared then interesting to investigate whether any change does actually occur in the phospholipid fractions of the sea-urchin egg upon fertilization. It must also be mentioned that ÖHMAN² had already found a decrease in the amount of free phospholipids in the sea-urchin egg 10 min after fertilization and on the basis of his experimental evidence he suggested that these became bound, probably to proteins.

The data presented in the Table show the results of a preliminary fractionation of the phospholipids of the unfertilized and fertilized eggs of the sea-urchin *Arbacia lixula* into a "free" and a "bound" fraction. Under the name of free those phospholipids are meant which can be extracted with cold ether, whereas the bound ones need a prolonged extraction with hot alcohol-ether. It appears that in the eggs of *Arbacia* there is a sizeable

³ H. W. DEANE, F. B. NESBETT, J. M. BUCHANAN et A. B. HASTINGS, J. cell. and compar. Physiol. 30, 255 (1947).

⁴ A. FICQ, F. GAVOSTO et M. ERRERA, Exper. Cell Res. 6, 69 (1954).

⁵ P. DROCHMANS, Arch. Biol. 61, 475 (1950).

⁶ WARDBURG cité dans «Manometric Methods» par M. DIXON (University Press, Cambridge, 1934).

¹ R. MAGGIO and A. MONROY, Exper. Cell Res. 8, 244 (1955).

² L. O. ÖHMAN, Ark. Zool. 35A, No 7 (1944).

Free and bound phospholipids in unfertilized and fertilized eggs of *Arbacia lixula*. μg phospholipid-P/100 μg total P

Exper. No.	Unfertilized eggs		Fertilized eggs					
	free	bound	3 min		6 min		15 min	
	free	bound	free	bound	free	bound	free	bound
1	4.3 $\pm$ 0.26	17.2 $\pm$ 0.68	1.9 $\pm$ 0.12	17.4 $\pm$ 0.52	2.9 $\pm$ 0.09	16.2 $\pm$ 0.09	3.0 $\pm$ 0.31	16.7 $\pm$ 0.77
2	9.2 $\pm$ 0.51	13.7 $\pm$ 0.30	5.9 $\pm$ 0.28	14.6 $\pm$ 0.11	7.28 $\pm$ 0.80	15.4 $\pm$ 0.57	9.26 $\pm$ 0.32	13.7 $\pm$ 0.61
3	6.1 $\pm$ 0.16	17.9 $\pm$ 0.16	5.0 $\pm$ 0.19	17.9 $\pm$ 0.12	5.2 $\pm$ 0.11	17.8 $\pm$ 0.20	5.8 $\pm$ 0.22	17.7 $\pm$ 0.06

decrease of the amount of the free phospholipids during the very first minutes after fertilization, followed by a recovery up to the amount present in the unfertilized eggs. No evidence, however, has been found of a binding of phospholipids except, perhaps, in the Experiment No 2, in which it looks as if some of the free phospholipids had been extracted with the bound fraction. This point needs further checks. Nor is any evidence at present available as to the process by which the decrease and the recovery of the amount of the free phospholipids occurs.

Experimental. Eggs of *Arbacia lixula*, unfertilized and at various time intervals after fertilization, were freed of their jelly-coat by treatment with acid sea-water (at pH of about 5), quickly collected by centrifugation and lyophilized. 3 batches were examined in which nearly 100% of the eggs were fertilized and showed normal development. About 15 analyses were carried out on each batch and the results were treated statistically. 10 mg samples of the dry material were extracted 3 times with ice-cold ether and the residue then re-extracted 3 times with alcohol-ether (3:1) at 70°C. The former fraction contains the easily extractable (i.e. so-called free) phospholipids while the latter contains the less easily extractable (i.e. so-called bound) phospholipids. The extracts were brought to dryness and the residue re-dissolved in chloroform. After evaporation of the latter, the residue was analyzed for P (by Allen's procedure). Total P in the dry eggs was taken as a reference.

The present investigations were supported by Grants from the Consiglio Nazionale delle Ricerche and Centro Sperimentale della Pesca to the Institute of Comparative Anatomy.

C. M. B. RICOTTA

Institute of Comparative Anatomy, the University, and Experimental Center of Fishery, Palermo, December 6, 1955.

Riassunto

Nelle uova di *Arbacia lixula* si osserva una diminuzione di fosfolipidi liberi nei primi minuti dopo la fecondazione, seguita poi da un aumento che riporta, nel corso di 15 min circa, la quantità di fosfolipidi liberi al valore delle uova vergini. Non pare che vi sia alcuna variazione quantitativa nella frazione dei fosfolipidi legati.

Relations entre oxydation phosphorylante et structure des mitochondries hépatiques de rats carencés en vitamines B₁ et B₂*

Au cours de notre étude expérimentale des avitaminoses du groupe B, nous avons constaté une diminu-

tion de la resynthèse oxydative de l'ATP¹, de la respiration et du quotient d'oxydation phosphorylante dans les homogénats hépatiques de rats carencés en vitamine B₁. L'activité ATP-asique des homogénats d'animaux normaux et carencés étant sensiblement égale, les troubles enregistrés semblent dus à un épuisement de la synthèse – et non à une augmentation de la scission – des phosphates labiles. Nous avons retenu également le fait suivant: Alors que les animaux en état de carence extrême peuvent être sauvés par l'injection intra-péritonéale de vitamine B₁ et présenter quelques jours plus tard un

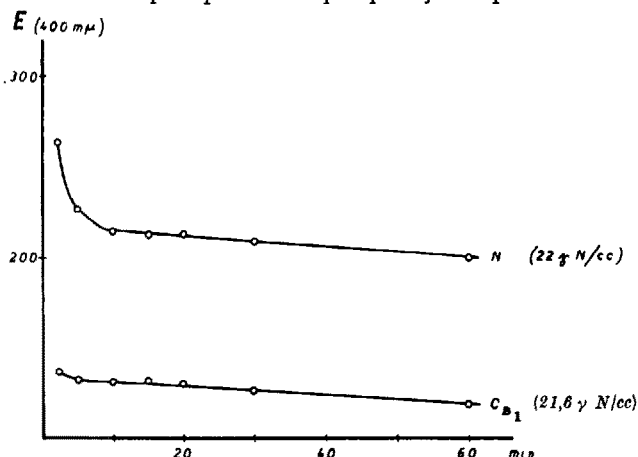


Fig. 1. Chute de densité optique des suspensions de mitochondries en fonction du temps. E = extinction photométrique (400 $m\mu$) des suspensions diluées 200 fois en solution de mannitol isotonique. N = rat normal. CB_1 = rat carencé. Entre parenthèses: valeurs d'azote protidique des suspensions.

pouvoir de phosphorylation tout à fait normal, l'addition d'aneurine ou de cocarboxylase *in vitro* est totalement inopérante. Cette constatation montre que l'avitaminose B₁ provoque au niveau des mitochondries plus qu'un trouble de la décarboxylation des métabolites du cycle de Krebs. La latence nécessaire à la restauration *in vivo* peut faire penser notamment à une atteinte de la structure des mitochondries. Il est actuellement bien établi que l'intégrité de l'infra-structure cellulaire est indispensable à une activité optimale des processus de phosphorylation². Aussi, avons-nous cherché à saisir un équivalent morphologique des altérations rapportées plus haut. A cet effet, nous avons comparé la densité optique des suspensions de mitochondries hépatiques provenant de rats normaux et carencés. La méthode employée, décrite par RAAFLAUB³, se base sur les constatations suivantes: les mitochondries en voie d'altération sont

¹ J. FREI, *Helv. physiol. Acta* (sous presse 1955).

² J. W. HARMAN et M. FEIGELSON, *Exp. Cell Res.* 3, 509 (1952). – J. W. HARMAN et A. KITTYAKARA, *Exp. Cell Res.* 8, 411 (1955).

³ J. RAAFLAUB, *Helv. physiol. Acta* 11, 142 (1953).

* Communication présentée au 3^e Congrès International de Biochimie, Bruxelles 1955.