

trations in the fixation medium when preparing reticulocytes for electron microscopy. Figure 5 shows a reticulocyte fixed by formalin in hypotonic medium and stained with phosphotungstic acid, giving evidence of the changes that occur with the mitochondrial filaments in which the internal bands are still discernible, but already show an increase in diameter and in the distance between the mitochondrial bands. These observations on the mitochondrial nature of the filament add further support to the hypothesis, suggested in a previous paper<sup>4</sup>, that the different morphology observed in reticulocytes haemolyzed under various conditions is due to osmotic effects. The aspect of reticulocytes observed by BRAUNSTEINER and BERNHARD<sup>3</sup> in electron microscope preparations after haemolysis in distilled water can also be explained by osmotic effects.

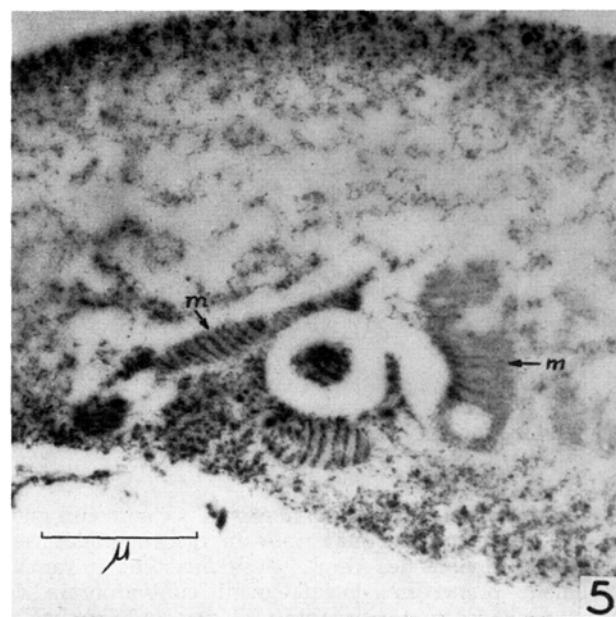


Fig. 5.—Electron micrograph of a thin section of reticulocyte with swollen mitochondria *m*. Formalin fixation in hypotonic medium. Stained with phosphotungstic acid.

From the above observations, it is strongly suggested that the "substantia granulo-filamentosa" in bleeding anaemias is a pre-existent structure inside the reticulocyte and that it is of mitochondrial nature or can originate from mitochondria during the maturation process of the cell.

A. BRUNNER JR., A. VALLEJO-FREIRE,  
and P. SOUZA SANTOS

*Laboratorio de Virus, Instituto Butantan, São Paulo,  
Brasil, March 6, 1956.*

#### Zusammenfassung

Retikulozyten von Meerschweinchen, in denen Anämie durch Blutentzug hervorgerufen worden war, wurden in Dünnschnitten elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei wurden dieselben filamentösen Körper mit charakteristischer Mitochondrienstruktur, die auch nach teilweiser Trocknung hämolysierter Ausstriche von Retikulozyten auftreten, gefunden. Diese Filamente formen die durch Vitalfärbung (Janusgrün B) dargestellte innere

Struktur der Retikulozyten und besitzen Affinität zu den spezifischen Mitochondrienfarbstoffen. Auf Grund dieser Feststellungen wird die Natur der «substantia granulo-filamentosa» für mitochondrienartig und somit präexistent gehalten.

#### Action de la triéthylénemélamine sur les mitoses de segmentation de l'œuf de Pleurodèle

L'action sur la mitose de la 2,4,6-triéthylèneimino 1,3,5-triazine ou triéthylénemélamine (TEM) a fait l'objet des travaux de BIESELE et col.<sup>1</sup>, sur des méristèmes radiculaires d'*Allium cepa*, de PLUMMER et col.<sup>2</sup>, sur des cultures de fibroblastes de Poulet, de ROSE, HENDRY et WALPOLE<sup>3</sup>, sur le testicule du Rat, et de ROSS<sup>4</sup>, sur *Vicia faba*. MEIER, DESAULLES et LOUSTALOT<sup>5</sup> ont comparé son action inhibitrice sur le développement du granulome expérimental et sur celui de diverses tumeurs du Rat.

Les œufs en segmentation de *Pleurodeles waltlii* Michah. ont été traités par des solutions de TEM, échelonnées de  $1/400$  à  $1/12\,000$ . Ils ont été fixés, après des temps variables, au sublimé-cobalt, inclus au méthyl-salicylate de celloïdine et colorés par la méthode de FLEMMING, suivant une technique qui a été exposée ailleurs<sup>6</sup>. Nous résumerons les conclusions tirées de l'examen de plus de 300 œufs, coupés en série.

1° Agglutination des œufs. La TEM, aux concentrations de  $1/200$  à  $1/2\,000$ , produit une forte agglutination des œufs, qui se collent entre eux par leur membrane vitelline. Ce pouvoir agglutinant disparaît dans les solutions vieillies, dont l'action sur les chromosomes persiste, à peine atténuée, et aux concentrations inférieures à  $1/4\,000$ .

2° Action sur le clivage et sur la polarité. Pendant les premiers cycles de segmentation, la TEM n'inhibe pas la segmentation, même si elle commence à pénétrer dans le cytoplasme aussitôt après la fécondation. Elle ne modifie pas la polarité du fuseau, ni l'aspect des sphères et des asters, sauf cependant dans deux cas: 1° quand elle agit aussitôt après la fécondation et que les œufs sont particulièrement sensibles: on obtient alors des morulas (à 16 blastomères par exemple), qui contiennent seulement 1 ou 2 noyaux, dépourvus de polarité; 2° à la fin de la segmentation, quand la puissance des pôles diminue normalement, ce qui rend le fuseau plus vulnérable. Dans les cas intermédiaires, on peut observer une dissociation entre la segmentation et l'activité des pôles, qui continue, d'une part et la chromatine altérée, qui évolue difficilement, d'autre part, d'où les mitoses pluripolaires (Fig. 1) et parfois la libération de multiples cytasters. La force active des pôles est cependant suffisante pour que des cycles mitotiques successifs se poursuivent jusqu'à la fin de la segmentation.

3° Action de rupture des chromosomes. La TEM est essentiellement un agent de rupture des chromosomes dans

<sup>1</sup> J. J. BIESELE, F. S. PHILIPS, J. B. THIERSH, J. H. BURCHENAL, S. M. MUCKLEY et C. C. STOCK, Nature 166, 1112 (1950).

<sup>2</sup> J. L. PLUMMER, L. T. WRIGHT, G. ANTIKAJIAN et S. WEINTRAUB, Cancer Res. 12, 796 (1952).

<sup>3</sup> F. L. ROSE, J. A. HENDRY et A. L. WALPOLE, Nature 165, 993 (1950).

<sup>4</sup> W. C. J. ROSS, Nature 165, 808 (1950).

<sup>5</sup> R. MEIER, P. A. DESAULLES et P. LOUSTALOT, Exper. 12, 61 (1956).

<sup>6</sup> P. SENTIN, Arch. Anat. micr. 43, 80 (1954); sous presse (1956).

*les mitoses de segmentation de l'œuf.* Elle a cette propriété en commun avec les phénols<sup>7</sup>, l'ypérite à l'azote<sup>8</sup> et la patuline<sup>9</sup>. Ces corps possèdent en plus une action sur le fuseau, que la TEM n'a qu'exceptionnellement. Elle ne provoque pas la gélatinisation réversible des chromosomes, particularité remarquable de l'action du *para-aminosalicylate de sodium*. A mesure que la concentration s'abaisse ( $1/_{4000}$  à  $1/_{12000}$ ), les ruptures, dues à la TEM, deviennent moins nombreuses et par conséquent les fragments plus longs.

La première manifestation de l'action sur les chromosomes n'est pas leur fragmentation, mais le «pseudo-chiasma» (3<sup>me</sup> h à  $1/_{500}$ , 5<sup>me</sup> h à  $1/_{1000}$  pour des œufs traités après la fécondation). Aussitôt après, apparaissent les ruptures, qui deviennent vite très nombreuses et sont particulièrement visibles dans les ponts dicentriques, à l'anaphase. L'accroissement précède donc la fragmentation, ce qui est en accord avec les conceptions de GOLDACRE, LOVELESS et ROSS<sup>10</sup> sur le rôle joué par la liaison en croix (cross-linkage) de chaînes moléculaires protéiques ou nucléoprotéiques. On ne peut donc pas distinguer un effet primaire «physiologique» et un effet secondaire «génétique», comme dans l'action des rayons X.

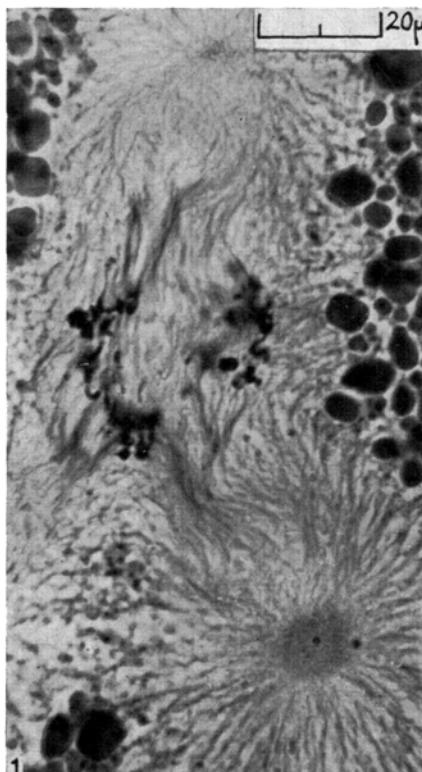


Fig. 1. Œuf traité à 2 blastomères par TEM  $1/_{400}$ , 6 h, et devenu morula. Partie d'une mitose pluripolaire, avec granules agglutinés.

Ces ruptures peuvent être visibles dès la prophase de la 1<sup>re</sup> mitose de segmentation. Elles donnent des bâtonnets, des granules et plus tard des anneaux, par réunion secondaire des extrémités rompues; ces fragments se disposent en chapelets («Perlenstruktur») (Fig. 2), ne

s'écartent jamais du fuseau et ne sont pas libérés dans l'hyaloplasme: il reste donc probablement entre eux un filament chromatique non rompu. Dans les cas favorables, ils apparaissent comme symétriques et identiques pour deux chromatides-filles, ce qui démontre que les ruptures ne se sont pas produites au hasard, mais en des points pré-déterminés par la structure normale du chromosome.

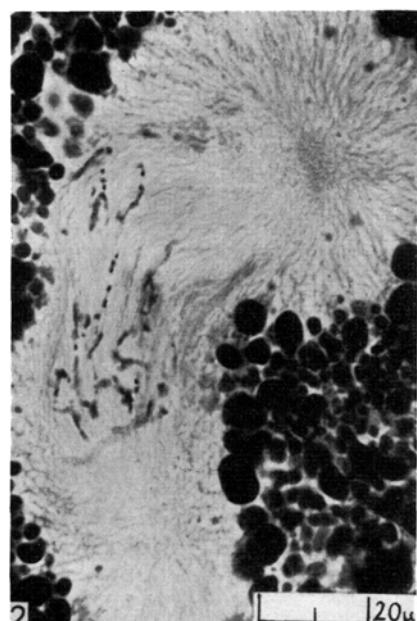


Fig. 2. Œuf de la même expérience. Torsion du fuseau et chapelets de grains.

4° *Actions secondaires sur le fuseau.* Ce sont des anomalies de la région équatoriale du fuseau, plicatures, coudures, torsions des fibres, qui manifestent un ramollissement prématûr, normalement contemporain de l'anaphase. Le fuseau est étalé et attiré transversalement, entraînant avec lui des fragments, souvent agglutinés: l'équateur est le seul endroit où les éléments acentriques tendent à s'écartier du fuseau. Ces anomalies deviennent moins nettes aux faibles concentrations.

Si l'action de la TEM est électivement chromosomique pendant la segmentation, elle cesse de l'être dans la gastrula, l'embryon et la jeune larve. Dans les mitoses épithéliales de celle-ci, l'action sur le fuseau devient primordiale (mitoses monopolaires) et les ruptures, beaucoup plus rares: il y a une inversion totale de l'action.

P. SENTÉIN

*Laboratoire d'Histologie, Faculté de Médecine, Montpellier, le 17 Mars 1956.*

#### Summary

Triethylenemelamine ( $1/_{400}$  to  $1/_{12000}$ ) induces pseudo-chiasmata and chromosome-breakage in the egg-segmentation mitoses of *Pleurodeles wallii* Michah. The primitive effect is stickiness, breakages appear subsequently, but without an interval of time between: the primary „physiological” and the secondary „genetical” effect cannot be separated. There are points of breakability, which explains the symmetry of certain fragments. The action is inverted in the epidermal cells of the larvae, where spindle alterations are prominent. Cytodieresis is never inhibited.

<sup>7</sup> P. SENTÉIN, C. r. Assoc. Anat. **41**, 445 (1955).

<sup>8</sup> P. SENTÉIN, C. r. Soc. Biol. **149**, 167 (1955).

<sup>9</sup> P. SENTÉIN, C. r. Soc. Biol. **149**, 1821 (1955).

<sup>10</sup> R. J. GOLDACRE, A. LOVELESS et W. C. J. ROSS, Nature **163**, 667 (1949).