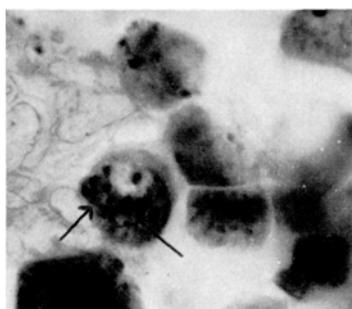


(3) WORLEY¹⁴ is of the opinion that the 'Golgi reticulum' is produced by the ruptured and elongated Golgi vesicles, and sometimes even the 'puddingstone' masses, as he observed in the active cells of frog pancreas, may appear in the form of a 'reticulum'.

I have studied the acinar cells of frog, toad, common house rat, and white rat pancreas by employing Aoyama, formaldehyde-osmium, Champy/iron-haematoxylin, formaldehyde-calcium/Sudan black, Lewitsky-saline/Sudan black¹⁵ or iron-haematoxylin and Regaud/iron haematoxylin or Sudan black techniques. To me it appears that in addition to the above reasons, the 'Golgi networks' may be formed in the amphibian pancreatic acinar cells due to the following causes also:



(1) When the zymogen synthesis starts in the cells, the medulla of the lipid vesicles, inside which the proteins are being synthesized, grows, and the outer sudanophil, osmophil, and argentophil cortex, which is ultimately reduced to a thin crescentic cap, is seen attached to the maturing zymogen granules. These residual lipid crescents detach from the extruding zymogen granules and aggregate haphazardly in the supra-nuclear region. Such an aggregation of the lipid remnants, if superficially observed, gives the appearance of the so-called disintegrated 'Golgi apparatus', said to have been observed during the resting phase or early discharge phase^{1,4}.

(2) With the onset of the discharge phase, there appear in the supra-nuclear zone, popularly known as 'Golgi zone' (free from zymogen granules), filamentous mitochondria which lie loosely interwoven and interspersed with the lipid granules and spheres. These mitochondria are stainable with acid fuchsine after Regaud, whereas the lipid bodies are not. These filamentous mitochondria, as well as the lipid bodies, are blackened in osmium tetroxide preparations to give the appearance of a typical 'Golgi network'. But the truth is revealed when such preparations are bleached with saturated solution of potassium persulphate and coloured afterwards with Sudan black B. This dye colours only the lipid bodies whereas the mitochondria remain uncoloured and hence there is no 'Golgi network'.

A very striking example of the filamentous mitochondria, appearing in the form of a 'network' (Golgi), is shown in the Figure, which is of a cell in recovery phase from Lewitsky/iron-haematoxylin preparation of white rat pancreas. Though this reticulum resembles closely the typical 'Golgi network', yet it is certain that it is composed of only the mitochondria, as no previous worker has ever described the 'Golgi network' in Lewitsky/haematoxylin preparations. If the fibrillar mitochondria can give the appearance of a 'network' in such *harmless* techniques,

one can very well imagine the appearance which this 'loose network' of the mitochondria would give, when drastic techniques like KOLATCHEV, AOYAMA, DA FANO etc., involving long metallic deposition, are employed.

My observation on the acinar cells of anurans and rat pancreas have thoroughly convinced me that most of the 'Golgi networks', appearing in osmium techniques, in the acinar cells during the late discharge and early recovery phases, are nothing but over-impregnated mitochondrial fibres.

Similar reasons for the appearance of the 'Golgi network' in neurones have been given by THOMAS¹¹ and CAIN¹⁶.

K. C. KANWAR

Department of Zoology, Panjab University, Hoshiarpur (India), June 25, 1958.

Résumé

Il a été montré que l'appareil réticulaire classique de Golgi dans les cellules pancréatiques des amphibiens et des mammifères est un produit artificiel. Un certain nombre de raisons sont proposées pour expliquer ce fait.

¹⁶ A. J. CAIN, Quart. J. micr. Sci. 89, 421 (1948).

Sur l'interaction de la Protamine avec des protéines sériques

De nombreux polyélectrolytes présentent des interactions avec les protéines sériques. Les plus connues de ces interactions sont la précipitation sélective des β -lipoprotéines par l'héparine ou le sulfate de dextrane en présence de Ca^{++} ou bien par certains autres polysaccharides sulfatés¹.

Ces mêmes polyélectrolytes présentent une interaction notable avec le complexe haptoglobine sérique-hémoglobine, dont elles empêchent la formation et inhibent son activité peroxydase². Comme l'haptoglobine est un mucoïde α_2 de pH isoélectrique 4,1, on comprend que l'interaction électrostatique ne soit pas le seul facteur déterminant l'affinité des polyélectrolytes pour les protéines sériques³.

Deux d'entre nous ont montré que la salmine ajoutée à un sérum humain normal ou pathologique produit une opacification initiale, suivie (pour une certaine concentration de salmine, 2 mg/ml) à 37°C d'une clarification⁴. L'étude physiopathologique de cette réaction fut effectuée par DE GENNES et TRUFFERT⁴. D'autre part, nous avons entrepris des expériences dont nous présentons ici les résultats préliminaires afin de préciser au point de vue physicochimique la nature de l'opacification et de la clarification.

Nous avons cherché tout d'abord à préciser quelles sont les protéines du sérum qui seraient susceptibles de former avec la salmine un complexe insoluble dans les conditions

¹ P. BERNFELD, V. M. DONAHUE et M. E. BERKOWITZ, J. biol. Chem. 226, 51 (1957).

² L. ROBERT, V. BAJIC et M. F. JAYLE, C. R. Acad. Sci. 242, 2868 (1957).

³ M. F. JAYLE et G. BOUSSIER, Exposés annuels de Biochimie Médicale (1956).

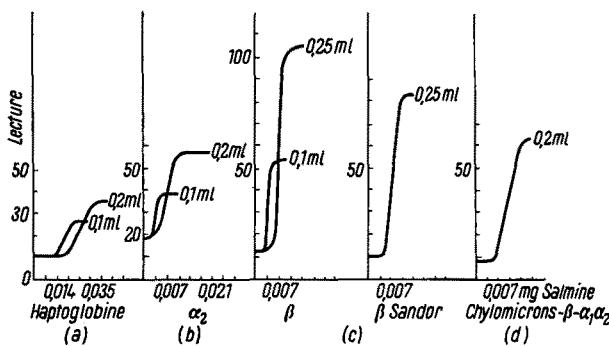
⁴ J. L. DE GENNES, Presse méd. 65, 263 (1957). – J. L. DE GENNES et J. TRUFFERT, C. R. Soc. Biol. 148, 1361 (1954); C. R. Soc. Biol. 149, 648 (1955).

¹⁴ L. G. WORLEY, J. Morph. 75, 261 (1944).

¹⁵ J. R. BAKER, Quart. J. micr. Sci. 97, 621 (1956).

mêmes où l'opacification et la clarification furent observées⁵.

Nous avons donc établi des courbes de titrage néphélo-métrique d'un certain nombre de protéines isolées et purifiées. Les protéines, dissoutes dans l'eau distillée ou dans un milieu salin dilué (volume final 10 ml), aux environs de pH 6,0, furent placées dans la cuve cylindrique du néphélosomètre Electrosynthèse (dont la photocellule entoure complètement la cuve cylindrique) et avons ajouté des quantités croissantes de salmine diluée (solution à 3,5 g/l diluée extemporanément 20 fois avec de l'eau distillée) à l'aide d'une micropipette à constriction. On lit la turbidité après chaque addition sur un galvanomètre A.O.I.P. (sensibilité $0,6 \cdot 10^{-3}$ A/mm, shunté selon les expériences à $1/3$ à $1/30$).



Courbe de titrage néphélo-métrique des lipoprotéines et de l'haptoglobine. Abscisses: mg salmine ajoutée. Ordonnées: turbidité du système, exprimée en unités arbitraires de lecture du galvanomètre.

a Haptoglobine humaine mélange des types Hp II - Hp II et Hp II - Hp I, 80% pur; solution à 3 mg/ml dans l'eau distillée.

b α_2 lipoprotéine du sérum humain obtenue par ultracentrifugation entre les densités de 1,100 et 1,063, solution de 0,6 mg/ml.

c β : β -lipoprotéine du sérum humain, obtenue par ultracentrifugation à une densité de 1,063 en solution dans le mélange salin KBr-NaCl à 8,77 g/l; 70 mg/ml, dont 76,5% de lipides. Concentration saline au cours du titrage: 0,08 à 0,43 g/l.

c β -Sandor: Euglobuline III de SANDOR⁶, solution à 70 mg/ml dans un tampon phosphaté à 0,01 M pH 7.

d Mélange de chylomicrons, de α - et de β -lipoprotéines obtenus par ultracentrifugation du sérum humain à une densité de 1,135. Concentration globale en lipides: 15 mg/ml.

Parmi les protéines purifiées que nous avons pu examiner, les suivantes ont donné des résultats intéressants:

Les sérumalbumines humaine (CNTS) et bovine (Armour) ne donnent pas de turbidité dans ces conditions, même si l'on ajoute de la protamine concentrée jusqu'à 3 mg pour les 2 mg de sérumalbumine.

La γ -globuline humaine non plus jusqu'à une quantité de 52 mg de protamine pour 20 mg de γ -globuline (dans l'eau distillée à pH 7,3).

Des résultats négatifs furent obtenus avec les mucoïdes sériques sulfosalicylosolubles ou perchlorosolubles, concentrés et dialysés. Par contre l'haptoglobine (mélange de Hp I-II/Hp II-II) partiellement purifiée, préparée par BOUSSIER⁷, donne une opacification très nette. La courbe a de la Figure montre la courbe de titrage néphélo-métrique obtenue.

Les lipoprotéines donnent aussi une opacification avec de très faibles quantités de salmine. Les courbes b, c, d de

Baisse de l'intensité d'opacification par le sulfate de dextrane et le cetavlon après l'incubation du sérum avec la salmine à 37° pendant 24 h

Nom	Sulfate de Dextrane % de baisse	Cetavlon % de baisse
MIG.	16,6%	22%
REB.	17 %	28%
GAS.	10 %	28%
GUE.	17 %	19%
GRO.	13 %	36%
ART.	14 %	30%
DUM.	14 %	21%
HUP.	28 %	38%
PRA.	13 %	43%
LUC.	18 %	0%
PRO.	19 %	32%
COL.	18 %	38%
GON.	21 %	36%
DEG.	10 %	50%
BOU.	20 %	32%
SER.	15 %	35%
DUM.	14 %	40%
COR.	17 %	50%

Les réactions ont été faites après une incubation de 24 h à l'étuve à 37° C de 1 ml de sérum + 0,2 ml de salmine à 1%.

la Figure donnent les résultats obtenus avec différentes préparations.

Qualitativement toutes ces courbes sont semblables: elles ont une forme en S, avec une branche horizontale (correspondant à la quantité minimum de salmine nécessaire pour induire l'opacification), une partie montante et une branche asymptotique.

L'analyse quantitative de ces courbes, qui sera décrite dans une note ultérieure⁸, montre que la salmine précipite avec la β -lipoprotéine dans un rapport stœchiométrique bien défini.

Les études de Ross⁹ ont montré qu'un grand nombre de protéines précipitent avec la protamine dans un rapport moléculaire bien défini à un certain pH. Pour la β -lipoprotéine du sérum normal ce «pH de transition» ne peut être très éloigné de 7, selon nos expériences. Sa valeur exacte est difficile à préciser car l'addition de tampons ou de base et d'acide à la protéine empêche l'opacification avec la protamine.

Parmi les protéines testées, seules les lipoprotéines et l'haptoglobine précipitent dans ces conditions (pH 6-7, solution diluée) avec la protamine. Les mucoïdes à pH isoélectrique bas du filtrat perchlorique et sulfosalicylique ne précipitent pas avec la protamine à ce pH contrairement aux haptoglobines du type Hp II-Hp II, dont le pH i est à 4,1 environ.

Ces résultats nous ont incités à expliquer les changements survenus au niveau du sérum en présence de protamine (opacification suivie de clarification) par les modifications subies par les lipo- et certaines glycoprotéines du sérum. En admettant que l'opacification soit due à une réaction entre la salmine d'une part et certaines lipo- et α -glucoprotéines d'autre part, ces protéines doivent être «modifiées» au cours de la clarification. On peut s'attendre à ce que cette modification se traduise par une réactivité diminuée aux tests plus ou moins spécifiques utilisés pour leur mise en évidence dans le sérum.

⁵ J. L. DE GENNES, Thèse de médecine (Paris 1957).

⁶ G. SANDOR, P. SLIZEWICZ et M. BURSTEIN, Bull. Soc. Chim. biol. 39, 843, 857 (1957).

⁷ G. BOUSSIER, C. R. Acad. Sci., Paris 246, 1769 (1958).

⁸ L. ROBERT, J. POLONOVSKI et J. TRUFFERT, Bull. Soc. Chim. biol., à paraître.

⁹ V. ROSS, Arch. Biochem. Biophys. 50, 34 (1954).

Le Tableau montre en effet que l'incubation du sérum avec la protamine diminue le taux des lipoprotéines (mises en évidence par le test de BURSTEIN modifié par BADIN et SCHMITT du sulfate de dextrane¹⁰) et celui des glycoprotéines (dosées par la méthode au cétablon de MARTIN et BADIN¹¹). La baisse constatée par ces 2 méthodes peut être interprétée de plusieurs façons. Parmi les hypothèses possibles nos expériences en cours s'accordent le mieux avec celle admettant la dégradation enzymatique des lipoprotéines après leur flocculation par la protamine. Notamment la clarification n'est plus constatée si le sérum est chauffé au préalable à 56° C 30 min et peut être inhibée par le CNK, la quinine et d'autres inhibiteurs des estérasées⁷. La clarification évolue d'autre part parallèlement avec la diminution du test au sulfate de dextrane. Un parallélisme semblable n'existe pas pour les glycoprotéines réagissant avec le cétablon : la baisse est instantanée après l'addition de la protamine et ne varie plus au cours de la clarification.

J. TRUFFERT, J. L. DE GENNES, L. ROBERT
et J. POLONOVSKI

*Laboratoire de Chimie de la Clinique Propédeutique,
Hôpital Broussais et Service de Chimie, Faculté de Médecine de Paris, le 5 août 1958.*

Summary

We noticed the formation of a precipitate on adding salmine to dilute aqueous protein solution at pH 6-7. Human and bovine serum albumin, human γ -globulin, and the perchloro- and sulfosalicylosoluble mucoides do not precipitate in this condition. α - and β -lipoproteins prepared by floatation and by Sandor's technique gave S-shaped nephelometric titration curves, as did haptoglobin, a mixture of the types Hp II-Hp II and Hp II-Hp I. In sera incubated 24 h at 37°C with protamin, the dextran sulphate test and the cétablon test show a diminished value for β -lipo- and α -glucoprotein. Lipoprotein degradation is probably enzymatic in nature.

¹⁰ J. BADIN et F. SCHMITT, Ann. Biol. clin. 15, 469 (1957).
¹¹ J. MARTIN et J. BADIN, Ann. Biol. clin. 15, 675 (1957).

Ein Beitrag zur irreversiblen Temperaturaktivierung der Gewebsatmung

Abgesehen von der Untersuchung von FIELD *et al.*¹ liegt bis heute keine weitere Beobachtung über Erholung einer Gewebsatmung nach Einwirkung einer hohen Temperatur – durch Rückkehr auf eine noch physiologische Temperatur – vor. Es wurde daher die Atmung der Leber und Haut von (Sommer-)Fröschen für $1/2$ - $2\frac{1}{2}$ h bei 47,5°C und anschliessend über eine weitere Stunde bei 37,5°C verfolgt.

Die Messung der Gewebsatmung erfolgte nach dem direkten Verfahren von Warburg in substratfreier Krebs-Phosphatringlerlösung, Gaspase: Luft.

Ein typisches Experiment ist in Abbildung 1 angegeben, die Resultate sind in Abbildung 2 zusammengefasst. Hierin bedeutet A die durchschnittliche Abweichung der nach der Inkubation bei 47,5°C bei einer Temperatur von 37,5°C gemessenen Atmung gegenüber der normalen At-

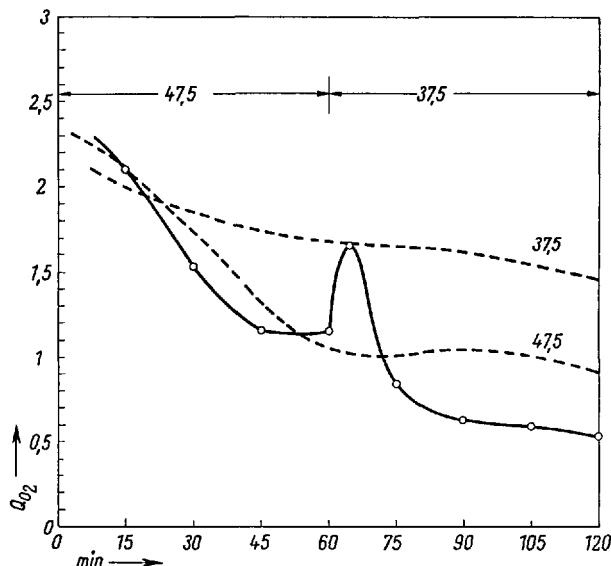


Abb. 1. Änderung der Gewebsatmung der Froschleber bei Überführung von 47,5°C in 37,5°C.

mung bei gleicher Temperatur. Sie ergibt eine mit Inkubationsdauer zunehmende statistisch signifikante Verminderung. Der Vergleich der Erholungsatmung bei 37,5°C mit der bei 47,5°C gemessenen Atmung des gleichen Zeitraums (Kurven B) ergibt an der Hautatmung keine durchschnittliche Abweichung, dagegen bleibt die Leberatmung trotz späterer Rückführung in 37,5°C niedriger als bei 47,5°C. Unmittelbar nach Temperaturwechsel treten, wie Abbildung 1 zeigt, bei 37,5°C schnell vorübergehende Anstiege der Atmung, sogenannte overshoots auf. Abbildung 2 lässt erkennen (Kurven C), dass diese besonders nach Inkubation von 1 und $1\frac{1}{2}$ h Dauer auftreten.

Es ruft demnach schon eine kurze Inkubation der Gewebe bei 47,5°C eine irreversible Enzym-Inaktivierung hervor. In den meisten Fällen kommt es aber zunächst zu einer vorübergehenden Aktivierung im Sinne von overshoot-Phänomenen, welche für den Sauerstoffverbrauch von Tieren bei Temperaturwechsel im suboptimalen Bereich neuerdings von GRAINGER² beschrieben worden sind. Dadurch ähneln die experimentellen Kurven (Abb. 1) sehr stark jenen, welche beim Einfluss hoher Konzentrationen von 4,6-Dinitro-o-kresol an der Atmung geschädigter Gewebe auftreten³, was im Sinne der Theorie von JOHNSON⁴ neuerlich für Gemeinsamkeiten in der Wirkung der Temperatur mit der chemischen Agentien spricht. Der merkwürdige Unterschied im Verhalten der Haut- gegenüber der Leberatmung (Abb. 2, B) erklärt sich zum Teil daraus, dass erstere bei 47,5°C einen stärkeren *in-vitro*-Abfall als letztere erfährt⁵. Die eigentliche Ursache für die Verminderung der Leberatmung auch nach Rückführung in 37,5°C gegenüber der gleichzeitigen Atmungshöhe von 47,5°C muss wohl darin erblickt werden, dass die Froschleber in stärkerem Masse als die Froschhaut Enzyme aufweist, deren Gleichgewicht nach dem inaktiven Zustand verschoben ist⁵. Die Temperatur von 47,5°C muss daher durch Verstärkung dieser Inaktivie-

² J. N. R. GRAINGER, Nature 178, 930 (1956).

³ A. LOCKER und K. H. SPITZY, Exper. 7, 350 (1951).

⁴ F. H. JOHNSON, H. EYRING und M. J. POLISSAR, *The Kinetic Basis of Molecular Biology* (New York-London 1954).

⁵ A. LOCKER, Z. Naturforsch. 13b, 548 (1958); Pflügers Arch. 267, 358 (1958).

¹ J. FIELD, F. A. FUHRMAN und A. W. MARTIN, J. Neurophysiol. 7, 117 (1944).