

The results reported confirm previous studies on the intact erythrocyte. In addition, it is now possible to be more specific regarding the enzyme systems involved. Inhibition was noted when either G-6-P or 6-PG was used as substrate. Since preincubation favors increased inhibition, it would appear, at least in the case of G-6-PD, that the phenothiazine blocks sites necessary for the action of the enzyme. By preincubating in the presence of TPN the inhibition is decreased, suggesting the preferential affinity of the apoenzyme for the TPN, thus preventing the enzyme-phenothiazine interaction. Alternatively, it is also possible that TPN forms a complex with the phenothiazine, thus preventing its binding to the apoenzyme.

It has been previously reported⁷ that TPN stabilizes partially purified G-6-PD from erythrocytes. More recently, MARKS et al.⁸ have presented evidence to indicate that TPN or G-6-P protects purified G-6-PD against inactivation by heat. The latter authors suggest that the substrate and coenzyme are important to the stability of the enzyme structure. In view of this, it is conceivable that phenothiazine inhibits the enzyme by influencing the TPN-enzyme interaction.

Similar findings have been reported in studies of other coenzymes. LASSLO and MEYER⁹ have reported a phenothiazine-enzyme complex with the D-aminoacid oxidase system and point to the structural analogy between the N-alkyl substituted phenothiazine and the N-ribityl substituted isoalloxazine moiety of flavin adenine dinucleotide (FAD), the coenzyme for this system. In addition, YAGI et al.¹⁰ have demonstrated the formation of complexes of chlorpromazine and flavins. They suggest that such an effect may have important *in vivo* significance, particularly in view of previous work which indicated that modifications in electroencephalogram patterns induced by chlorpromazine could be reversed by FAD¹¹.

Tab. II. Effect of TPN concentration on inhibition of Glucose-6-phosphate dehydrogenase

TPN (μ moles)	% Inhibition
0.46	49
0.92	42
1.38	30
1.84	19

Phenothiazine Concentration 1.5 μ moles. Assay: same as under Table I.

Résumé. La thiopérazine, qui est un dérivé de la famille de la phénothiazine, a le pouvoir d'inhibition sur l'activité du glucose-6-phosphate déhydrogénase et du 6-phosphogluconate déhydrogénase dans les globules rouges. Ce pouvoir est modifié si on ajoute du TPN dans le système enzymatique. Le degré de cette modification correspond à la dose de TPN employée.

M. J. CARVER, JOY D. MARKS, and NADINE ROESKY

Nebraska Psychiatric Institute and Department of Biochemistry, University of Nebraska College of Medicine, Omaha, March 21, 1961.

⁷ H. N. KIRKMAN, Nature 184, 1291 (1959).

⁸ P. A. MARKS, A. SZEINBERG, and J. BANKS, J. biol. Chem. 236, 10 (1961).

⁹ A. LASSLO and A. L. MEYER, Nature 184, 1922 (1959).

¹⁰ K. YAGI, T. OZAWA, and T. NAGATSU, Biochim. biophys. Acta 43, 310 (1960).

¹¹ K. YAGI, T. OZAWA, M. ANDO, and T. NAGATSU, J. Neurochem. 5, 304 (1960).

sont divisés en trois groupes. L'un de ces groupes constitue les embryons témoins que l'on fixe à la fin de la gastrulation, au moment de la formation du mésenchyme secondaire. L'animalisation est provoquée en traitant les œufs fécondés par une solution contenant 0,004% de chlorure de zinc dans l'eau de mer⁸. La végétalisation est obtenue en traitant les œufs fécondés par une solution de chlorure de lithium à la concentration 0,026 M. Après 24 h les embryons sont enlevés des solutions, lavés et reportés dans l'eau de mer normale où ils poursuivent leur développement pendant 20 h. Toutes les cultures sont faites à la température du laboratoire. Les embryons animalisés sont des blastulas hyperciliées présentant une extension considérable de l'épaississement apical ectodermique et de la touffe ciliée apicale. L'archentéron n'est pas formé; quelques cellules mésenchymateuses sont situées au pôle végétal. Les embryons végétalisés sont caractérisés par une énorme vésicule entodermique à parois épaisses et par une petite vésicule ectodermique à parois minces. Des cellules mésenchymateuses et des cellules pigmentaires sont réparties dans le blastocèle.

¹ J. RUNNSTRÖM, Roux' Arch. 113, 556 (1928).

² J. RUNNSTRÖM and G. KRISZAT, Exp. Cell Res. 3, 497 (1952).

³ R. LALLIER, C. R. Acad. Sci. 250, 3380 (1960).

⁴ R. LALLIER, Exper. 8, 271 (1952).

⁵ C. M. CHILD, Roux' Arch. 135, 426 (1936).

⁶ S. HÖRSTADIUS, J. exp. Zool. 129, 249 (1955).

⁷ S. BÄCKSTRÖM, Reducing Agents and Activities in Sea Urchin Development (Almqvist and Wiksell, Boktryckeri AB., Uppsala 1959).

⁸ R. LALLIER, Arch. Biol. 66, 75 (1955).

Étude cytochimique des groupes sulphydriés au cours des modifications de la détermination embryonnaire chez l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*

Le développement de l'œuf d'oursin est gouverné par les relations mutuelles et compétitives entre un gradient animal et un gradient végétal¹. L'équilibre entre ces deux gradients peut être modifié expérimentalement par des méthodes opératoires ou par l'action d'agents chimiques appropriés, avec comme conséquence l'extension des structures entomésodermiques (végétalisation) ou ectodermiques (animalisation).

Nous nous proposons d'examiner et de comparer la distribution des groupes sulphydriés dans les embryons végétalisés, animalisés et témoins. Les considérations suivantes font ressortir l'intérêt de l'étude des groupes sulphydriés au cours des modifications expérimentales de la détermination embryonnaire. L'animalisation est en effet provoquée par certaines substances capables de réagir avec les groupes sulphydriés telles que l'acide *o*-iodosobenzique², un dérivé organique du mercure, le Salyrgan³, ainsi qu'un dérivé sulphydrilé, l'acide thiomalique⁴. D'autre part, l'animalisation et la végétalisation interfèrent avec les gradients de réduction mis en évidence par CHILD⁵ et HÖRSTADIUS⁶ au cours du développement embryonnaire; ces gradients peuvent correspondre à une répartition égale de substances réductrices parmi lesquelles on peut considérer les dérivés sulphydriés⁷.

Méthodes. Les œufs de l'oursin *Paracentrotus lividus* sont utilisés dans ces expériences. Les œufs fécondés et lavés

Les embryons sont fixés pendant 12 h dans une solution aqueuse d'acide trichloroacétique à 5%. Ils sont ensuite inclus dans la paraffine selon les techniques habituelles et coupés à 15 μ d'épaisseur. Sur chaque lame on place en trois groupes séparés les embryons animalisés, végétalisés et les témoins. Cette disposition a pour but d'uniformiser les conditions de coloration et de faciliter les comparaisons entre ces trois types d'embryons. Les coupes sont collées à l'eau gélatineuse. L'emploi de l'albumine est évité pour cet usage en raison de la présence des groupes sulfhydryles dans l'albumine. La méthode de BENNETT⁹ est utilisée pour la détection des groupes sulfhydryles. Ces groupes donnent une coloration orange avec le réactif de Bennett, le 1-(4-chloromercuriphenylazo)-2-naphtol. Les coupes sont mises pendant 3 h dans une solution saturée de 1-(4-chloromercuriphenylazo)-2-naphtol (L. Light & Co.) dans l'éthanol à 80°. La spécificité de la réaction est éprouvée sur des coupes témoins dans lesquelles le blocage des groupes sulfhydryles est effectué au préalable par des réactifs spécifiques de ces groupes. Nous avons à cet effet traité les coupes pendant 24 h dans une solution saturée d'acide phénylmercuribenzoïque ou d'acide *p*-chloromercuribenzoïque dans l'éthanol à 80°. L'absence de coloration ultérieure par le réactif de Bennett indique que les groupes sulfhydryles ont été bloqués par ces agents. Ces deux agents se sont montrés également efficaces à cet égard. Il est ainsi possible de considérer que la coloration due au réactif de Bennett dans les coupes non traitées est liée à la présence des groupes sulfhydryles. L'observation de la coloration faiblement orange des coupes est facilitée par l'emploi de filtres constitués par un film photographique coloré avec une solution de bleu de toluidine¹⁰. Dans ces conditions la coloration apparaît en rouge sur fonds bleuté.

Résultats. Nous avons au préalable observé la répartition des groupes sulfhydryles au stade 2 blastomères. Pendant la métaphase, la coloration rouge signalant la présence des groupes sulfhydryles, est particulièrement intense au niveau des fuseaux et des asters. Ces observations sur l'œuf de *Paracentrotus lividus* confirment les observations antérieures faites par KAWAMURA et DAN¹⁰ sur les œufs des 4 espèces d'oursins: *Clypeaster japonicus*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Pseudocentrotus depressus* et *Mespilia globulus*.

L'observation microscopique des embryons animalisés, végétalisés et témoins a été faite sur les sections dont le plan de coupe passe par les pôles animal et végétal. Sur les coupes d'embryons animalisés, on repère facilement le pôle animal grâce à l'épaississement apical ectodermique très accentué, et le pôle végétal où se trouve localisé un petit groupe de cellules mésenchymateuses primaires. L'orientation des embryons végétalisés est également facile puisque la plupart d'entre eux sont formés d'une partie ectodermique de petite taille, à parois minces, raccordée à une partie entomésodermique très volumineuse et à parois épaisses. Les embryons animalisés et végétalisés ainsi que les témoins sont colorés en rouge et la coloration apparaît uniformément répartie sur chaque coupe. Nous en concluons qu'il n'y a pas de gradients de répara-

tion des groupes sulfhydryles dans les gastrulas témoins et dans les embryons animalisés et végétalisés dans ces conditions. La coloration est sensiblement de même intensité dans les gastrulas témoins et dans les embryons végétalisés. Les embryons animalisés présentent de nettes différences à cet égard, certaines coupes d'une même préparation apparaissent plus colorées que d'autres. D'une façon générale, et compte tenu de ces variations individuelles, la coloration des embryons animalisés est plus accentuée que celle des gastrulas témoins et des embryons végétalisés. Ce phénomène présente un intérêt particulier si l'on se rappelle que le zinc utilisé pour provoquer l'animalisation présente lui-même une certaine affinité pour les groupes sulfhydryles. Dans ces conditions, on pourrait s'attendre à une diminution des groupes sulfhydryles colorables par le réactif de Bennett. L'étude de ce phénomène pourra être abordée par le dosage direct des groupes sulfhydryles aux différentes étapes de l'animalisation par les ions zinc. BÄCKSTRÖM¹¹ a étudié par des méthodes microchimiques et histochimiques les groupes sulfhydryles dans les embryons animalisés par l'acide *o*-iodosobenzoïque et dans les embryons végétalisés par le lithium. La concentration en groupes sulfhydryles présente une série de variations au début du développement, puis elle diminue au moment de la différenciation du squelette et de l'intestin. Par rapport aux témoins, la teneur en groupes sulfhydryles reste toutefois légèrement supérieure dans les embryons animalisés et légèrement inférieure dans les embryons végétalisés. Aucune relation n'apparaît entre la distribution des groupes sulfhydryles et les gradients de réduction⁷. Les observations de BÄCKSTRÖM et les nôtres montrent que l'animalisation et la végétalisation n'entraînent pas de perturbations notables dans la répartition des groupes sulfhydryles. La participation éventuelle de ces groupes aux processus de l'animalisation et de la végétalisation reste à déterminer par l'analyse des effets d'autres agents animalisants et végétalisants. Nous rappellerons qu'en ce qui concerne les ions zinc, leur affinité pour les groupes sulfhydryles n'apparaît pas jouer un rôle essentiel dans leur action animalisante, puisque, en effet, un métal très proche du zinc, le cadmium, n'exerce qu'une faible action animalisante alors que son affinité pour les groupes sulfhydryles est supérieure à celle du zinc.

Summary. A cytochemical study of the distribution of sulfhydryl groups in animalized and vegetalized embryos of the sea-urchin *Paracentrotus lividus* has been made by use of the Bennett's reagent. The distribution of the sulfhydryl groups appears homogeneous in these embryos. No gradient has been observed in the experimental conditions used.

LUCIENNE FENAUX

Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer (Alpes Maritimes, France), le 22 mars 1961.

⁹ H. S. BENNETT, Anat. Rec. 110, 231 (1951).
(1958).

¹¹ S. BÄCKSTRÖM, Exp. Cell Res. 16, 165 (1959).

¹⁰ N. KAWAMURA et K. DAN, J. biophysic and biochem. Cytol. 4, 615

purified dehydrogenase⁴ catalyzes an irreversible two-step dehydrogenation of UDPG at the carbon-6 of glucose: $UDPG + 2 DPN^+ \rightarrow UDPGA + 2 DPNH + 2 H^+$.

¹ G. J. DUTTON and I. D. E. STOREY, Biochem. J. 53, xxxvii (1953).

² J. L. STROMINGER, H. M. KALCKAR, J. AXELROD, and E. S. MAXWELL, J. Amer. chem. Soc. 76, 6411 (1954).

³ J. L. STROMINGER, E. S. MAXWELL, J. AXELROD, and H. M. KALCKAR, J. biol. Chem. 224, 79 (1957).

Histochemical Demonstration of Uridine Diphosphate Glucose Dehydrogenase

In mammalian liver, the biosynthesis of glucuronides involves the formation of uridine diphosphoglucuronic acid (UDPGA)¹. This 'active glucuronate' is formed from uridine diphosphate glucose (UDPG) by a diphosphopyridine nucleotide (DPN)-specific dehydrogenase^{2,3}. The