

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 sulfhydriles dans l'albumine. La méthode de BENNETT⁹ est utilisée pour la détection des groupes sulfhydriles. 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 sulfhydriles 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 sulfhydriles 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 sulfhydriles. 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 sulfhydriles au stade 2 blastomères. Pendant la métaphase, la coloration rouge signalant la présence des groupes sulfhydriles, 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 répartition

des groupes sulfhydriles 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 sulfhydriles. Dans ces conditions, on pourrait s'attendre à une diminution des groupes sulfhydriles colorables par le réactif de Bennett. L'étude de ce phénomène pourra être abordée par le dosage direct des groupes sulfhydriles aux différentes étapes de l'animalisation par les ions zinc. BÄCKSTRÖM¹¹ a étudié par des méthodes microchimiques et histochimiques les groupes sulfhydriles dans les embryons animalisés par l'acide *o*-iodosobenzoïque et dans les embryons végétalisés par le lithium. La concentration en groupes sulfhydriles 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 sulfhydriles reste toutefois légèrement supérieure dans les embryons animalisés et légèrement inférieure dans les embryons végétalisés. Aucune relation n'apparaît entre la distribution des groupes sulfhydriles 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 sulfhydriles. 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 sulfhydriles 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 sulfhydriles 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 FENAU

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

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

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

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).

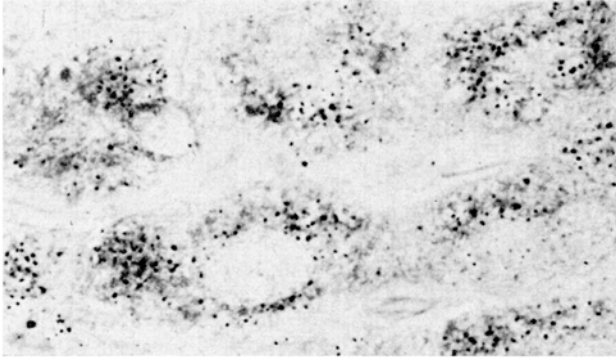


Fig. 1. Sites of UDPG dehydrogenase activity in rat liver epithelium. $\times 960$.

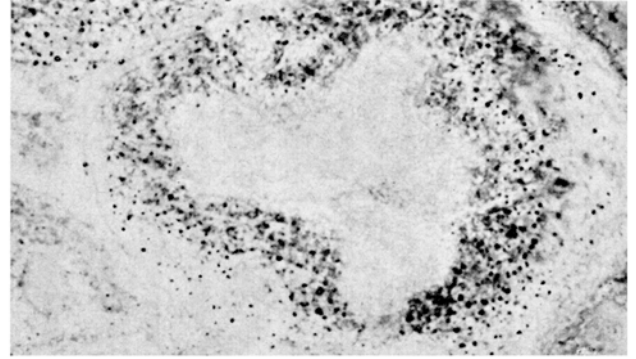


Fig. 2. UDPG dehydrogenase activity in proximal tubule of rat kidney. No reaction in distal tubule (bottom). $\times 960$.

The histochemical demonstration of sites of DPN reduction is achieved by the transfer of hydrogen from reduced coenzyme to tetrazolium salt (hydrogen acceptor) by a flavoprotein separate from the dehydrogenase. Although in sections of tissues where UDPG dehydrogenase has been shown to occur, an abundance of DPNH-tetrazolium reductase can be demonstrated to be present, tetrazole was inefficient as sole hydrogen acceptor in a system involving the oxidation of UDPG. It was found necessary to introduce a quinone (2-methyl-1:4-naphthoquinone, menadione) as intermediate electron carrier to tetrazolium. Apparently, endogenous tetrazolium reductase does not react sufficiently with DPNH generated by soluble³ UDPG dehydrogenase. In this case, hydrogen transfer to tetrazole is better accomplished by a quinone-reductase system which is highly active in the cytoplasmic (i.e. microsomal and soluble) fractions⁵. Coating of sections with purified bacterial diaphorase did not improve the histochemical reaction. Phenazine methosulfate could not substitute for menadione as electron carrier.

Fresh sections from blocks of rat or mouse tissue, quenched in liquid oxygen, were cut at $5\ \mu$ on a cryostat and incubated at 37° for 30 min in a medium containing: UDPG (from yeast), $5 \times 10^{-4}\ M$; DPN, $3 \times 10^{-3}\ M$; menadione, $2 \times 10^{-5}\ M$; 3,5-diphenyl-2-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl) tetrazolium (MTT), $1 \times 10^{-3}\ M$; CoCl_2 , $2.4 \times 10^{-3}\ M$; trishydroxymethyl aminomethane-HCl buffer, $0.1\ M$, pH 7.4; bovine serum albumin 1% (*w/v*). Control sections were incubated in medium lacking substrate.

Strong UDPG dehydrogenase activity was found in liver epithelium (Figure 1) and in the proximal tubular cells of kidney (Figure 2). Weak activity could be demonstrated in heart muscle fibres, in fibrocytes, and in cells of hyaline cartilage. Both skeletal muscle and intestinal epithelium were inactive. In contrast to liver cells of adult animals, no UDPG dehydrogenase activity was found in foetal liver. Low levels of both UDPGA and uridine diphosphate-trans-glucuronylase in foetal liver homogenate has been described by DUTTON⁶.

In the presence of both menadione and oxidized coenzyme, the 'nothing dehydrogenase' effect^{7,8} was pronounced even at pH 7.4. This effect necessitated the use of a suboptimal pH³ for the histochemical reaction and it was essential to compare the results to non-substrate controls. Suboptimal conditions may be responsible for our failure to demonstrate UDPG dehydrogenase in certain sites where the enzyme can be assumed to be present as, for instance, in gastric mucosa⁹.

Except for liver, a histochemical survey of various organs of the rat failed to establish a positive relationship between UDPG dehydrogenase and β -glucuronidase activity. At present, therefore, the hepatic parenchyma is the only structure for which histochemical evidence of a 'UDP-cycle'¹⁰ is available.

Zusammenfassung. Es wird eine Methode zur histochemischen Lokalisation der Aktivität von DPN-spezifischer UDPG-Dehydrogenase beschrieben. Das Wasserstoff übertragende System vom reduzierten Coenzym zu N-Thiazol-substituiertem Monotetrazol (Reduktionsindikator) bestand in der endogenen Menadionreduktase. Stärkste UDPG-Dehydrogenaseaktivität fand sich in Leberepithelien und proximalen Nierentubuli ausgewachsener Tiere (Ratte, Maus).

R. HESS and A. G. E. PEARSE

Department of Pathology, Postgraduate Medical School, London (England), March 16, 1961.

⁴ E. S. MAXWELL, H. M. KALCKAR, and J. L. STROMINGER, Arch. Biochem. Biophys. 65, 2 (1956).

⁵ R. HESS and A. G. E. PEARSE, Nature, in press (1961).

⁶ G. J. DUTTON, Biochem. J. 71, 141 (1959).

⁷ E. RACKER, Physiol. Rev. 35, 1 (1955).

⁸ H. ZIMMERMANN and A. G. E. PEARSE, J. Histochem. Cytochem. 7, 271 (1959).

⁹ G. J. DUTTON and I. H. STEVENSON, Biochim. biophys. Acta 31, 568 (1959).

¹⁰ H. M. KALCKAR and E. S. MAXWELL, Physiol. Rev. 38, 77 (1958).

Erythropoese bei bilateral nephrektomierten Kaninchen¹

Es wird heute übereinstimmend angenommen, dass die Erythrozytenproduktion durch einen Plasmfaktor, Erythropoetin genannt, stimuliert wird. Der Ort der Erythropoetinbildung ist nicht sicher bekannt. Aus klinischen Beobachtungen der letzten Jahre sowie aus tierexperimentellen Untersuchungen wurde gefolgert, dass die Niere

die Bildungsstätte eines erythropoetisch hochwirksamen Prinzips sein müsse. So fand man, dass bei Patienten mit bestimmten schweren Nierenerkrankungen wie Hypernephrom, Nierencarcinom, Hydronephrose, Cystenniere, gleichzeitig eine Polyzythämie bestand, die gelegentlich nach Entfernung der erkrankten Niere wieder verschwand.

¹ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.