

Riassunto. È descritto un processo endomeiotico in *Daphnia pulex* dove la maturazione delle uova partenogenetiche veniva finora ritenuta di tipo ameiotico. L'endomeiosi e la conseguente possibilità di ricombinazione genetica mostrano la possibilità di comparsa di genotipi sessuali multipli e spiegano la riduzione della variabilità sessuale

in allevamenti di Dafnidi riprodottisi partenogeneticamente per molte generazioni.

G. BACCI, G. COGNETTI, and A. M. VACCARI

Istituto di Zoologia dell'Università di Modena (Italy), July 28, 1961.

Extraction et isolement d'une hormone placentaire à effet inhibiteur sur l'utérus¹

Le liquide amniotique prélevé sur des grossesses humaines jeunes et intactes a un pouvoir inhibiteur sur la motilité utérine de la rate, du cobaye et de la lapine. Son effet consiste dans un abaissement du tonus et dans une diminution de la fréquence et de l'amplitude des contractions spontanées de l'utérus²⁻⁴. Cette action pharmacologique particulière du liquide amniotique, confirmée récemment par CUPARENCU⁵ a pu être reproduite sur l'utérus *in situ* de la rate et de la lapine⁶⁻⁸ et sur l'utérus *in situ* de la rate portante⁹. Outre l'inhibition utérine, le liquide amniotique provoque également une hyperémie de l'utérus et des ovaires de la rate. L'origine placentaire du facteur inhibiteur et du facteur provoquant l'hyperémie des ovaires a pu être démontrée par leur production *in vitro* dans des cultures de cellules choriales¹⁰. Des travaux récents ont abouti à l'extraction et l'isolement de l'hormone en question de l'urine de femmes enceintes. La présente communication donne une description sommaire du procédé utilisé et des résultats obtenus. Pour simplifier, le facteur inhibiteur et d'hyperémie est désigné par les lettres P.P.F. (Pregnancy Protecting Factor).

(1) *Méthode d'extraction.* La préparation schématisée dans le Tableau I consiste à extraire la dite substance par précipitations répétées en milieu acide avec un solvant organique, de soumettre les précipités à des dialyses prolongées et de séparer les protéines insolubles et inactives par centrifugation. On obtient ainsi un produit purifié (U 11) titrant 1200–3400 Unités-Rat par mg de substance sèche.

(2) *Méthode d'isolement.* L'extrait U 11 est ensuite séparé en une fraction protéique inactive et en un péptide glycidique biologiquement actif. Cette séparation se fait avec le procédé suivant: On dissout 6 mg de l'extrait U 11 dans 0,3 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 1%. Le mélange est déposé sur une ligne droite longue de 30 cm située à 5 cm de distance du bord d'un papier filtre Whatman No. 2 (dimensions 35 × 35 cm). Chromatographie ascendante dans un solvant éthanol à 50% à la température de 4° pendant 16 h. Après que le papier ait été séché à la température ambiante, on découpe la zone de papier comprise entre les valeurs Rf 0,11–0,38 et on l'élue en chambre humide à 4° avec de l'eau distillée. L'éluat est lyophilisé, puis déminéralisé par ultra-filtration sous pression de 8 atmosphères d'un mélange gazeux composé de 95% d'oxygène et de 5% d'anhydre carbonique.

(3) *Résultats biologiques.* Le procédé indiqué fournit une substance sèche contenant par mg 25 000–50 000 U. Rate. 0,05 γ/ml de cet extrait produisent une inhibition de la motilité spontanée de l'utérus isolé de la rate en pro-oestrus. 0,01–0,025 γ de la dite substance injectée par voie intrapéritonéale à des rats femelles d'un poids de 35–45 g provoquent une hyperémie des ovaires qui se reconnaît à une coloration rouge intense et persistante des ovaires 16 h après l'injection.

(4) *Propriétés physiques et chimiques de l'hormone isolée.* La substance isolée est très soluble dans l'eau. Elle n'est

pas précipitée par l'éthanol ou l'acétone à 50%. En solution alcoolique 15–20% de l'activité biologique traversent des ultracellfiltres «feinst» (Membranfilter-Gesellschaft, Göttingen). La substance est instable dans l'eau distillée à la température ambiante et perd 80% de son activité biologique dans les 6 h. Conservée à 4° sous forme

Tab. I. Méthode d'extraction du P.P.F.

	Conditions de température
1000 ml urine congelée	– 15°
décongelée, filtrée par laine de verre	4°
+ HCl conc. –pH 3,3	
+ 4 Vol. acétone puriss.	– 15°
centrifuger	– 15°
surnageant = U 1/227	
précipité = U 2/227	
+ 50 ml H ₂ O dist.	4°
+ HCl conc. pH 3,3	
+ 4 Vol. acétone puriss.	– 15°
centrifuger	
surnageant = U 3/227	
précipité = U 4/227	
+ 75 ml H ₂ O dist.	4°
dialyse 120 h contre	4°
2000 H ₂ O dist. échangé	
toutes les 6 h	
dialysat centrifuger	
surnageant = U 5/227	
+ HCl conc. pH 3,3	4°
+ 4 Vol. acétone puriss.	– 15°
centrifuger	– 15°
surnageant = U 7/227	
précipité = U 8/227	
sécher 60 min	– 15°
+ 20 ml H ₂ O dist.	4°
dialyse 16 h contre	
2000 H ₂ O dist.	
dialysat centrifuger	
surnageant = U 9/227	
sédiment = U 10/227	4°
Lyophilisation = résidu sec = U 11/227	

¹ Ce travail a été bénéficié de l'appui du Fonds national suisse de la recherche scientifique.

² O. STAMM, *Avortements tardifs et accouchements prématurés* (Masson & Cie., Paris 1959).

³ O. STAMM et H. DE WATTEVILLE, *Gyn. et Obstr.* 53, 171 (1954).

⁴ O. STAMM, *Arch. Gynäk.* 182, 663 (1953).

⁵ B. CUPARENCU, *Zentralbl. Gynäk.* 82, 192 (1960).

⁶ O. STAMM, *Arch. Gynäk.* 184, 761 (1954).

⁷ O. STAMM, *Gynaecologia* (Basel) 136, 377 (1953).

⁸ O. STAMM, *Gynaecologia* (Basel) 135, 125 (1953).

⁹ D. DESSARZIN, Thèse No. 2741, Université de Genève.

¹⁰ O. STAMM et M. PACCAUD, *Arch. Gynaek.*, sous-*presse*.

lyophilisée, l'activité se maintient pendant au moins 2 mois. Le résultat de l'analyse élémentaire et du dosage des hexoses et hexosamines est résumé dans le Tableau II. A l'encontre de l'hormone placentaire protéique (gonadotrophine choriale) isolée récemment par BOURILLON et GOT¹¹, le P.P.F. se distingue par un pourcentage en azote nettement plus faible (6,52% à la place de 10,5% trouvé par GOT) et un taux en substances glucidiques plus élevé (41% à la place de 19,7%, GOT). L'analyse qualitative des acides aminés par chromatographie après hydrolyse en tube scellé révèle la présence d'au moins 7-10 acides aminés.

Tab. II. Caractères analytiques du P.P.F. (facteur inhibiteur et hypérémie)

Activité biologique (unités rate/mg)	25 000-50 000
N (%)	6,52
C (%)	46,68
H (%)	7,3
Hexoses (%)	26,0
Hexosamines (%)	15,0
Acides aminés, approximativement	7-10

Drosophila Tumors and the Structure of Larval Lymph Glands

Hereditary *Drosophila* tumors are usually melanotic formations which arise in the larvae through an aggregation and subsequent melanization of lymph cells. During the larval or pupal stage, the cellular character of these formations disappears, and the adults show only easily detectable pigment masses. Phenocopies of these tumors can be induced by several substances^{1,2}. As shown in former experiments³⁻⁵, they also can be induced very frequently (about 70%) by injecting acellular larval extracts of tumorous (*tu*^g, *se e*¹¹ *tu*^{49h}) and tumorless (*e*¹¹) stocks of *D. melanogaster* into larvae of the tumorless *yw* stock.

The same extracts failed to induce such phenocopies in Berlin wild stock; this means that a host specificity exists for the induction of melanotic formations in *Drosophila*. In *yw* even an injection of physiological solution succeeded in inducing a small but significant number (18.4%) of melanotic tumors, demonstrating how easy it is to induce such formations in this stock. The production of these formations is probably caused by a defence reaction of the insect, as was also shown by WALKER⁶ in investigations with the parasite *Pseudocoila bochei*.

The problem is to show what structure or what kind of mechanism is responsible for the different reactions of *yw* and Berlin wild to the injection of acellular extracts. The present paper deals with the first part of a series of different investigations aimed at clarifying this problem.

The structure of the lymph gland of *Drosophila* larvae has been described by several authors^{7,8}. This gland is situated near the dorsal vessel and consists of pairs of lobes on both sides of this vessel. As seen in Figure a, the first two pairs of lobes are usually bigger than the other pairs. Because the lymph gland produces the lymph cells, it is also often called the blood-forming organ. As reported by some investigators⁹⁻¹², the structure of the lymph gland is generally more intact in tumorless than in tumorous stocks, even though also tumorless stocks can have very loose lymph glands. On the other hand, the authors found no tumorous stock with completely intact

Nous en concluons que le P.P.F. (facteur d'inhibition utérine et d'hypérémie ovarique) est, dans sa forme actuelle, un complexe formé d'acides aminés et de sucres avec un poids moléculaire relativement peu élevé.

Summary. Description of a process for extraction and isolation of a placental hormone with the following biological and chemical properties: (1) Inhibition of the spontaneous contractions of the isolated rat-uterus with 0.05 γ /ml. (2) An ovarian hyperaemia reaction is produced by intraperitoneal injection of 0.01-0.025 γ to rats weighing between 35 and 45 g. (3) The biologically active product is of comparatively low molecular weight. Analytical research suggests as principal constituents amino-acids and sugars.

O. STAMM

Clinique universitaire de Gynécologie et d'Obstétrique, Genève, Centre de transfusion et Laboratoire central de l'Hôpital cantonal, Genève (Suisse), le 15 mai 1961.

¹¹ R. BOURILLON, R. GOT et R. MARCY, Bull. Soc. Chim. biol. 41, 267 (1959).

lymph glands. Therefore, a loose character of the lymph gland seems to be necessary for producing tumors in *Drosophila*, although it is undoubtedly not the only prerequisite for their formation.

In the present investigation, I examined lymph glands of the following tumorless and tumorous stocks which I used in the induction experiments: *yw*, Berlin wild (hosts), *tu*^g, *se e*¹¹ *tu*^{49h}, *e*¹¹ (donors). To prevent the age of the larvae and environmental factors from influencing the structure of the lymph glands in a different manner, the

Lymph gland structure and tumor penetrance.

Stocks*	% tumor incidence
Berlin wild	0
<i>e</i> ¹¹	0
<i>yw</i>	0
<i>tu</i> ^g	± 70
<i>se e</i> ¹¹ <i>tu</i> ^{49h}	± 60

* The column is arranged so as to classify the lymph gland structure from the compact (top) to the very loose (bottom). Differences are slight between *e*¹¹ and *yw*, and between *tu*^g and *se e*¹¹ *tu*^{49h}; greater between Berlin wild and *e*¹¹, and between *yw* and *tu*^g.

¹ M. C. CASTIGLIONI and S. BEATI, Exper. 10, 501 (1954).
² M. C. CASTIGLIONI, Atti II Riunione A.G.I., La Ricerca Scientifica, Suppl. 26, 125 (1957).
³ G. RÖHRBORN, Diplomarbeit, Humboldt-Universität, Berlin (1955).
⁴ G. RÖHRBORN, Dros. Inf. Serv. 30, 148 (1956).
⁵ G. RÖHRBORN, Arch. Entw. mech. Org. 150, 115 (1957).
⁶ I. WALKER, Rev. Suisse Zool. 66, 569 (1959).
⁷ M. B. STARK and A. K. MARSHALL, J. Amer. Inst. Homeopathy 23, 1204 (1930).
⁸ H. H. EL SHATOURY, Arch. Entw. mech. Org. 147, 489 (1955).
⁹ C. BARIGOZZI, J. cell. comp. Physiol. 52, 371 (1958).
¹⁰ C. BARIGOZZI, M. C. CASTIGLIONI, and A. DI PASQUALE, Exper. 14, 443 (1958).
¹¹ C. BARIGOZZI, M. C. CASTIGLIONI, and A. DI PASQUALE, Heredity 14, 151 (1960).
¹² C. BARIGOZZI, M. C. CASTIGLIONI, and A. DI PASQUALE, ACTA 16, 53 (1960).