

Glykokoll: 10 g, Aneurin: 0,1 mg, Cystein: 10 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 8,3 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 3,4 mg, Leitungswasser ad 1 l, pH mit HNO_3 auf 4,2. Der genannte Zusatz von Fe^{++} und Zn^{++} ist für die verwendeten *Claviceps*-Stämme optimal und wesentlich². Die Kulturen wurden bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Nach 10 Tagen hatte sich eine dünne, weisse Myceldecke gebildet. Nach 20 Tagen war das Mycel dick und begann sich rötlich zu verfärben. Nach 60 Tagen waren Mycel und Nährlösung dunkelviolettblau verfärbt (Tabelle II).

Alkaloidverteilung. Nach Extraktion der Gesamtalkaloide wurde die Zusammensetzung des Gemisches durch quantitativ-papierchromatographische Methoden^{1,3} ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle III wiedergegeben.

Es zeigt sich, dass das Alkaloidspektrum in saprophytischer Kultur nur kleine Abweichungen gegenüber jenem in parasitischer Kultur aufweist. Bezüglich des quantitativen Anteiles der einzelnen Alkaloide innerhalb des

Spektrums sind zum Teil erhebliche Unterschiede feststellbar.

Summary. Three monoconidial strains of *Claviceps purpurea* were grown parasitically on rye and saprophytically on a nutrient medium. The qualitative alkaloid spectra were nearly identical in the sclerotia and in the corresponding saprophytic cultures, while the quantitative distribution of some of the alkaloids differed considerably.

H. KOBEL, R. BRUNNER und A. BRACK

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel (Schweiz), 29. Dezember 1961.

² A. STOLL, A. BRACK, A. HOFMANN und H. KOBEL, U.S. Patent Nr. 2809920 (1957).

³ A. STOLL und A. RÜEGGER, Helv. chim. Acta 37, 1725 (1954).

Végétalisation de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus* par le chloramphénicol

Au cours de son développement, l'œuf d'oursin élabore les protéines nécessaires à la différenciation de l'embryon. On peut en inférer que les modifications expérimentales de la différenciation perturbent les synthèses protéiques. Réciproquement des modifications de la différenciation embryonnaire doivent pouvoir être provoquées par des substances chimiques capables d'altérer le métabolisme des protéines. Chez l'oursin le développement peut être modifié expérimentalement en traitant les œufs par des substances chimiques déterminées. C'est ainsi que le lithium provoque la végétalisation, c'est à dire l'extension des structures entomésodermiques¹. L'animalisation, phénomène correspondant à l'extension des structures ectodermiques, est aisément obtenue avec les ions zinc² et certains dérivés polysulfoniques³. Différentes indications ont déjà été recueillies montrant que les agents actifs sur la détermination embryonnaire perturbent également le métabolisme protéique. Le lithium ralentit la synthèse des protéines⁴ et inhibe l'élaboration de certaines enzymes mitochondriales⁵. Un nombre croissant de données indique que la plupart des protéines cellulaires sont synthétisées au niveau des particules ribonucléoprotéiques, les ribosomes⁶. Or nous avons montré dès 1950⁷ que le lithium change la distribution de l'acide ribonucléique dans les particules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques. Toutes ces observations suggèrent que les effets végétalisants du lithium sont liés à des perturbations des synthèses protéiques. Des recherches ont été faites en vue de changer la différenciation de l'œuf d'oursin en agissant sur les synthèses protéiques avec des analogues d'acides aminés. Une végétalisation assez faible a pu être obtenue avec certains d'entre eux en combinant leur action avec celle du lithium. Cette action peut toutefois être rattachée à d'autres propriétés de ces substances telles que, par exemple, leur tensioactivité ou leurs propriétés chélatrices⁸.

Dans le présent travail nous examinerons les effets d'un inhibiteur des synthèses protéiques, le chloramphénicol⁹ sur la différenciation de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*. Nous étudierons également l'influence du chloramphénicol sur les effets végétalisants du lithium et sur l'animalisation provoquée par les ions zinc et un colorant polysulfonique, le bleu d'Evans.

Aux concentrations comprises entre 2 et 1 mg/ml, le chloramphénicol inhibe la division cellulaire; cette action est d'autant plus forte que la concentration est plus élevée. Les anomalies de la segmentation sont variées. L'inhibition peut être totale, empêchant complètement la formation des deux premiers blastomères. Souvent un seul des deux premiers blastomères est bloqué, tandis que l'autre subit une série de segmentations. Les blastomères polynucléés sont fréquemment observés. Dans les cultures contenant de 1 à 0,7 mg/ml de chloramphénicol, la proportion d'œufs arrêtés au cours de la segmentation diminue et le développement se poursuit, bien que fortement ralenti, jusqu'au stade blastula. Ces blastulas, après éclosion, s'agglomèrent très facilement en formant des masses arrondies constituées de dizaines ou même davantage de larves. On rencontre tous les intermédiaires entre l'adhérence simple par contact avec conservation de la structure des blastulas et la fusion complète avec coalescence des blastocèles. Laissées en présence de chloramphénicol, les blastulas se lysent et la lyse commence généralement par les cellules du pôle animal. Les embryons traités pendant 23 h par le chloramphénicol puis reportés, après lavages, dans l'eau de mer, achèvent de s'y développer en formant des larves végétalisées typiques. Tous les degrés de végétalisation comparables à ceux provoqués par le lithium ont été obtenus en traitant les œufs pendant 23 h par le chloramphénicol. Les concentrations les plus favorables pour obtenir la végétalisation vont de 1 mg/ml à 0,7 mg/ml.

En raison de son activité végétalisante propre le chloramphénicol doit être capable d'augmenter les effets végétalisants de faibles quantités de lithium. Nous avons effectivement observé que les œufs traités simultanément par le chloramphénicol (0,5 mg/ml) et le chlorure de lithium (0,0065 M) se développent en embryons fortement

¹ C. HERBST, Z. wiss. Zool. 55, 446 (1892).

² R. LALLIER, Arch. Biol. 66, 75 (1955).

³ R. LALLIER, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 30, 185 (1957).

⁴ T. GUSTAFSON et M. B. HJELTE, Exp. Cell Res. 2, 474 (1951).

⁵ T. GUSTAFSON et I. HASSELBERG, Exp. Cell Res. 2, 642 (1951).

⁶ P. Z. ZAMECNIK, The Harvey Lectures 1958-1959, 256.

⁷ R. LALLIER, Bull. Soc. Chim. Biol. 32, 451 (1950).

⁸ T. GUSTAFSON et S. HÖRSTADIUS, Exp. Cell Res. Suppl. 3, 170 (1955).

⁹ E. F. GALE et J. P. FOLKES, Biochem. J. 53, 493 (1953).

végétalisés. En présence de chloramphénicol seul (0,5 mg/ml), des pluteus se développent. Dans les cultures contenant du chlorure de lithium seul (0,0065 M) les pluteus présentent quelques traces de végétalisation indiquées par l'étroitesse du lobe oral et de la bouche et les parois épaissies de l'archentéron. En contraste les embryons traités simultanément par le chloramphénicol et le chlorure de lithium ne se développent jamais en pluteus; ils forment des larves fortement végétalisées constituées d'une petite vésicule ectodermique à parois minces et d'une énorme vésicule entodermique à parois épaisses.

Nous avons également examiné les effets du chloramphénicol sur l'animalisation. En raison de ses propriétés végétalisantes, on peut en effet prévoir que le chloramphénicol sera capable d'atténuer ou même de supprimer complètement les effets de l'animalisation. Nous avons effectivement observé que le chloramphénicol utilisé à des concentrations de 0,8 à 0,5 mg/ml inhibe les effets animalisants des ions zinc. En présence d'ions zinc (1×10^{-4} M), on obtient des blastulas animalisées. Leur touffe ciliée apicale est hyperdéveloppée et son extension correspond sensiblement aux types $1/2$ et $3/4$ selon la classification de HÖRSTADIUS¹⁰. Dans les cultures contenant du chloramphénicol (0,8 mg/ml) et du chlorure de zinc (1×10^{-4} M) aucune blastula animalisée ne se développe. L'une de ces cultures a donné 37% de petits pluteus, 40% d'embryons prismatiques, 14% de gastrulas chez lesquelles l'archentéron est seulement ébauché et enfin 9% d'embryons présentant une petite évagination de l'archentéron. Le chloramphénicol inhibe également l'animalisation provoquée par le bleu d'Evans. L'inhibition de l'animalisation provoquée par le zinc ou le bleu d'Evans est d'autant plus forte que la concentration en chloramphénicol est plus élevée.

Ces expériences montrent que le chloramphénicol exerce des effets végétalisants typiques, comparables à ceux déjà obtenus avec le lithium et avec la phénazone¹¹. Les effets du chloramphénicol et ceux de la phénazone présentent en outre un certain nombre de particularités communes intéressantes. Ces deux agents ont en effet une activité antimittotique importante^{12,13}. La formation de blastulas permanentes dans les cultures continues s'observe également avec le chloramphénicol et avec la phénazone. Nous avons observé au cours de ces recherches que les ions potassium n'empêchent pas les effets végétalisants du chloramphénicol ni ceux de la phénazone. A cet égard les effets de ces deux agents diffèrent de ceux du lithium dont les effets végétalisants sont supprimés en présence de concentrations suffisantes d'ions potassium^{14,15}. Les analogies observées entre les effets exercés sur le développe-

ment de l'œuf d'oursin par le chloramphénicol et par la phénazone peuvent se montrer utiles pour l'interprétation des effets pharmacodynamiques de la phénazone. Chez les bactéries où ses effets ont été particulièrement étudiés, le chloramphénicol inhibe la synthèse des protéines par un processus d'ailleurs non élucidé. En outre, aux concentrations où il inhibe la synthèse des protéines, cet agent provoque l'accumulation d'une forme particulière et instable d'acide ribonucléique¹⁶. De nouvelles recherches sont nécessaires afin d'établir si de telles perturbations du métabolisme des protéines et des acides nucléiques s'observent également chez les œufs d'oursin traités par le chloramphénicol. Le fait que le chloramphénicol exerce des effets végétalisants comparables à ceux du lithium suggère que le lithium agit sur la détermination embryonnaire en perturbant le métabolisme des protéines et des acides nucléiques. Une analyse comparée des effets du chloramphénicol et du lithium sur le métabolisme des protéines et des acides nucléiques permettra de préciser ce point de vue. Outre le chloramphénicol, d'autres agents sont également capables d'interférer avec la synthèse des protéines et des acides nucléiques. Dans un prochain travail nous examinerons les effets de quelques-uns de ces agents et les comparerons avec ceux du lithium et du chloramphénicol.

Summary. Chloramphenicol, an inhibitor of protein synthesis, causes a strong vegetalization of whole larvae of sea urchin *Paracentrotus lividus*. Combination of chloramphenicol and lithium causes a stronger vegetalization than either of these agents alone. Chloramphenicol suppresses the animalizing effects of Evans blue and zinc ions. The effects of chloramphenicol are compared with those of lithium and phenazone. It is suggested that vegetalizing effects of chloramphenicol are connected with its inhibitory action on protein synthesis and the perturbations of ribonucleic acid metabolism.

R. LALLIER

Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer (Alpes maritimes, France), le 9 janvier 1962.

¹⁰ S. HÖRSTADIUS, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 14, 251 (1935).

¹¹ R. LALLIER, Exper. 15, 228 (1959).

¹² E. E. PALINCAR, Biol. Bull. 119, 329 (1960).

¹³ G. DEYSSON, C. R. Acad. Sci. 228, 1047, 1306 (1949).

¹⁴ J. RUNNSTRÖM, Acta Zool. 9, 365 (1928).

¹⁵ R. LALLIER, Exp. Cell Res. 21, 556 (1960).

¹⁶ F. C. NEIDHARDT et F. GROS, Biochim. biophys. Acta 25, 513 (1957).

Quantitative Investigation of the P and N Loss in the Rat Liver when Using Various Media in the 'Freeze-Substitution' Technique

It has been established in the preceding paper¹ that the solubility of proteins in tissues fixed by the freeze-substitution technique is comparable to that in control and lyophilized material. This solubility as may be surmised is an indication of certain losses in tissue substances in the course of histological procedure. The determination of these losses is of great importance in the developing quantitative histochemical methods. Many authors²⁻¹⁰ have discussed this problem in relation to various histochemical fixatives. The F-S method enables the application of various media and temperatures¹¹⁻¹⁴ and this may lead to various degrees of extraction of the tissue substances.

¹ K. OSTROWSKI, J. KOMENDER, and K. KWARECKI, Acta biochim. pol. 8, 83 (1961).

² E. HARBERS and K. NEUMANN, Z. Naturforsch. 10 b, 377 (1955).

³ J. HARTLEIB, H. DIEFENBACH, and W. SANDRITTER, Acta histochem. 2, 196 (1956).

⁴ S. LAGERSTÄDT, Exper. 12, 425 (1956).

⁵ S. LAGERSTÄDT, Z. Zellforsch. 45, 472 (1957).

⁶ R. W. MARRIAM, J. Histochem. Cytochem. 6, 43 (1958).

⁷ W. SANDRITTER and J. HARTLEIB, Exper. 11, 313 (1955).

⁸ U. STENRAM, Exp. Cell Res. 15, 174 (1958).

⁹ B. SYLVEN, Extrait de Acta Union int. contre le cancer 7, 700 (1951).

¹⁰ B. SYLVEN, Freezing and Drying (Inst. Biol. London 1951), p. 169.

¹¹ J. J. FREED, Lab. Invest. 4, 106 (1955).

¹² N. M. HANCOX, Exp. Cell Res. 13, 263 (1957).

¹³ L. ORNSTEIN, B. J. DAVIS, TELEPOROS, and S. KOULISH, 1er Congrès International d'Histochemie et de Cytochimie, Paris (1960), Résumés (Pergamon Press 1960), p. 6.

¹⁴ W. L. SIMPSON, Anat. Rec. 80, 173 (1941).