

the egg-shell protein in trematodes. The one widely known mechanism is that of quinone-tanning. In trematodes having this type of egg-shell, one can normally see that the sites occupied by vitelline cells and the shells of uterine eggs gradually turn brown after fixation and preservation. In the second condition, at present known to occur only in Paramphistomatidae, the egg-shell represents a product of keratinization involving disulphide bonds. Consequently, upon fixation and preservation for any length of time the regions occupied by vitelline cells and the completed egg-shells remain colourless. This striking contrast between the two conditions can be vividly seen in the accompanying microphotograph (Figure)<sup>9</sup>.

*Résumé.* On a découvert que, dans la famille des Paramphistomatidae (Trematodes), la coquille de l'œuf,

transparente et sans couleur, est une kératine-type de scléroprotéine, constituée de disulphide en chaînes ( $-S-S-$ ). On sait que chez d'autres trématodes, la coquille d'œuf, d'une couleur ambrée, est une protéine de quinone.

R. MADHAVI

*Department of Zoology, Andhra University, Waltair (India), July 24, 1965.*

<sup>9</sup> I am grateful to Dr. K. HANUMANTHA RAO for helpful suggestions and criticism, and to Prof. P. N. GANAPATI for facilities and encouragement. Thanks are also due to the authorities of C.S.I.R. for the award of a Research Fellowship.

### Résistance de la souris et du souriceau à l'hypothermie prolongée à 20°C. Observations portant sur près de 500 animaux

Des travaux sur les réactions endocriniennes de la souris à différentes températures nous ont amené à pratiquer sur près de 500 animaux des hypothermies prolongées à 20 et 23°C en utilisant les méthodes de GIAJA et de son école. Etant donné le petit nombre de travaux publiés sur ce sujet (hypothermie prolongée sans agent pharmacodynamique) et l'importante quantité d'animaux traités, il nous a paru utile de rédiger une note essentiellement technique sur les résultats obtenus, c'est à dire sur la résistance de la souris à ces basses températures.

Comme nous l'avons déjà écrit<sup>1</sup>, suivant la méthode de GIAJA et de l'école de Belgrade<sup>2</sup> rapportée par MAROIS<sup>3</sup>, nous amenons les souris à la température désirée (20°C, température rectale – quelquefois 23°C) par asphyxie au froid. Pratiquement, nous opérons ainsi: les animaux sont placés au frigidaire à 4°C dans un bocal hermétiquement clos (2 adultes ou 3 souriceaux pour un bocal de 0,5 l) jusqu'au moment où ils paraissent prêts à s'affaïsser; dans les conditions ci-dessus décrites, il faut pour arriver à ce stade de 60 à 80 min aux adultes et de 40 à 55 min aux souriceaux. On vérifie alors la température rectale et, pour maintenir les animaux dans les mêmes conditions thermiques, il suffit à ce moment-là de les immerger dans de l'eau à cette température; on glisse donc les souris dans des sacs en tissu très aéré (tulle) qui leur permettent de respirer mais les immobilisent complètement; les animaux ainsi ligotés sont introduits dans l'eau de façon à ce que seules leurs têtes émergent. Ils vivent ainsi plus ou moins longtemps mais ne se réchauffent absolument pas.

Nous avons traités par cette méthode 310 souris adultes d'une part (244 mâles et 66 femelles) et 180 souriceaux de 25 jours environ d'autre part (10 mâles et 170 femelles). Ces animaux avaient subi des traitements divers mais la plupart des adultes devaient nous permettre de comparer l'action de l'hormone thyroïdienne sur la thyroïde de la souris en hypothermie à celle que nous observions dans des conditions de vie normales; certains avaient été soumis auparavant à des régimes destinés à mettre leur thyroïde au repos. Quant aux souriceaux, le plus grand nombre d'entre eux était destiné à tester la réaction de

l'utérus à des injections de folliculine à ces basses températures.

Dans un travail d'ensemble à publier ultérieurement, nous indiquerons tous les résultats obtenus; nous ne donnons ici que des chiffres globaux sur la durée moyenne de vie de la souris aux températures de 20 et 23°C. Il est apparu, en effet, que cette durée moyenne de vie ne variait pratiquement pas suivant les traitements, d'un sexe à l'autre ni du souriceau à l'adulte; nous devons signaler cependant qu'elle peut être nettement prolongée si l'on soutient les animaux en cours d'expérience avec des injections de sérum glucosé. Nous avons utilisé ce procédé pour le dernier lot d'animaux soumis à l'hypothermie et nous avons fait vivre une souris à 20°C près de 70 h alors que nous n'avions jamais dépassé 50 h auparavant; la moyenne de vie de l'ensemble de ce lot est bien supérieure également aux résultats antérieurs.

Sur les 490 animaux soumis à l'hypothermie prolongée, nous avons obtenu les pourcentages de résistance suivants (Tableau I).

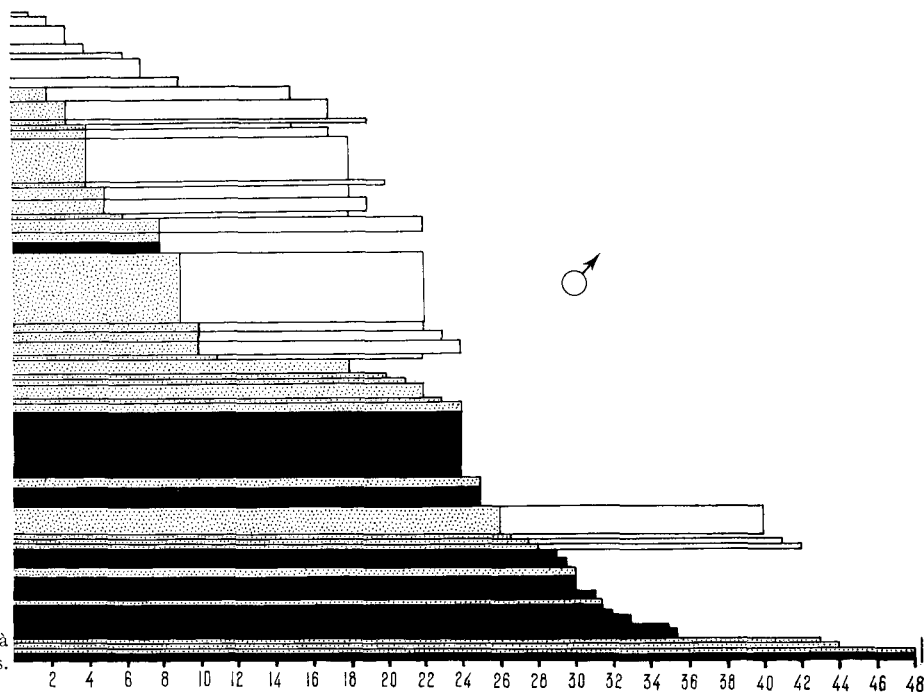
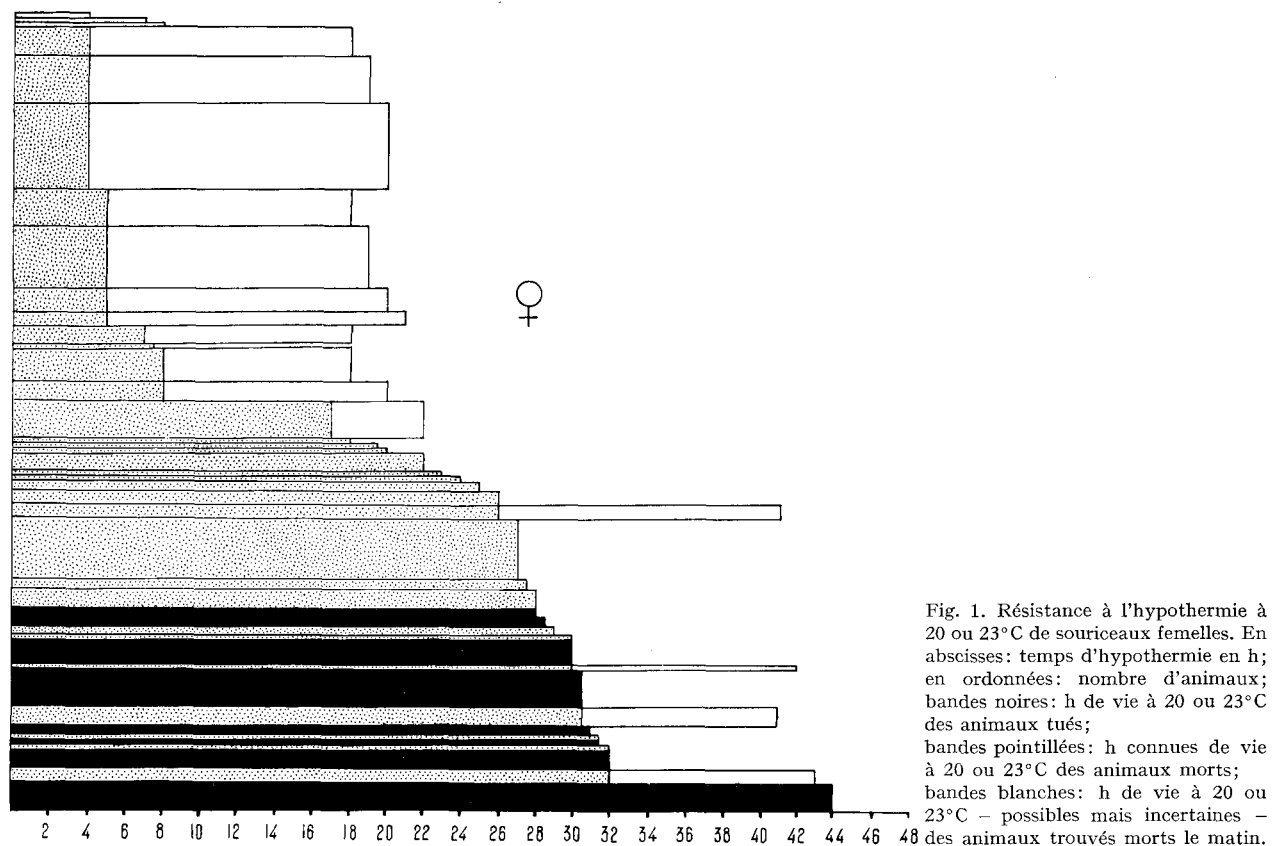
A titre d'exemple, nous donnons un Tableau plus détaillé de résistance à ces basses températures, qui porte sur deux lots d'animaux: l'un de 229 souris adultes mâles et l'autre de 150 souriceaux femelles (Tableau II).

Il nous paraît utile enfin d'ajouter à ces chiffres deux graphiques qui évoquent cette même résistance à l'hypothermie prolongée et où nous avons fait figurer trois catégories d'animaux: (1) Ceux qui ont été tués à des heures déterminées, car notre but – rappelons-le – n'était pas d'étudier la survie maxima de la souris à 20 ou 23°C mais l'examen de certains organes dans ces conditions; ces animaux auraient donc pu vivre plus longtemps et sont représentés par des bandes noires. (2) Ceux qui sont morts à des heures connues car les souris étaient, durant la journée, surveillées toutes les quinze minutes, et qui figurent sous forme de bandes pointillées. (3) Ceux enfin qui, vivant le soir, étaient trouvés morts au matin; cette dernière période de vie, possible mais incertaine, est représentée par des bandes blanches.

<sup>1</sup> J. FLATIN et M. DELSOL, *Ann. Endocrin.* 20, 761 (1959).

<sup>2</sup> J. GIAJA, XXème congrès international de Physiologie, Bruxelles (1956), vol. 1, p. 103.

<sup>3</sup> M. MAROIS, *C. r. Soc. Biol.* 150, 57 (1956).



Ces résultats obtenus sur un grand nombre d'animaux complètent ceux qu'ont observé les auteurs soit sur la souris, soit sur d'autres espèces; GIAJA<sup>2</sup> signale en effet qu'OBRENOVIC fait vivre des souris à 22–24°C de 30 à 32 h; avec le rat, ANDJUS<sup>4</sup> a obtenu 52 h à 23°C et WARRE<sup>5</sup> plusieurs jours à 24°C; de leur côté<sup>6</sup> ARIEL,

BISHOP et WARREN ont maintenu des lapins au dessus de 20°C pendant 48 h, pour ne citer que quelques chiffres proches des nôtres.

*Conclusion.* Nous pouvons donc conclure que l'on fait vivre assez facilement plus de 20 h des souris maintenues en hypothermie à 20 ou 23°C sans emploi d'agent phar-

macodynamique (plus de 40% dans l'ensemble de nos expériences); un petit nombre d'animaux arrive à vivre de 48 à 50 h dans ces conditions; des injections de sérum glucosé permettent de dépasser nettement ce seuil

puisque'une souris a vécu ainsi près de 70 h. Nous n'avons pas observé de différence de résistance à l'hypothermie prolongée entre les animaux mâles et femelles, entre les souriceaux et les adultes.

Tableau I

	plus de 20 h	plus de 30 h	plus de 40 h
Souris adultes, mâles et femelles	41,86%	13,49%	5,88%
Souriceaux, mâles et femelles	44,25%	21,26%	3,44%

Tableau II

Nombre d'heures connues de vie à 20-23°C	moins de 8	8-16	16-24	24-32	32-40	40-48
Nombres d'adultes mâles	86	47	16	61	10	9
Nombre de souriceaux femelles	56	11	14	55	8	6

**Summary.** We have found that mice can be made to live for more than 20 h when they are kept in hypothermia at 20 or 23°C without using any pharmacodynamic agents (more than 40% over the whole of our experiments); a small number of animals succeed in living from 48 to 50 h under such conditions; injections with serum containing glucose allow this limit to be easily surpassed, since a mouse thus lived for 70 h. We have noted no difference in the resistance to prolonged hypothermia between males and females, or between the young mice and the adult ones.

J. FLATIN et M. DELSOL

*Laboratoire de Biologie générale, Université Catholique de Lyon (France), le 17 septembre 1965.*

<sup>4</sup> R. ANDJUS, Thèse Faculté des Sciences Université Beograd (1953).

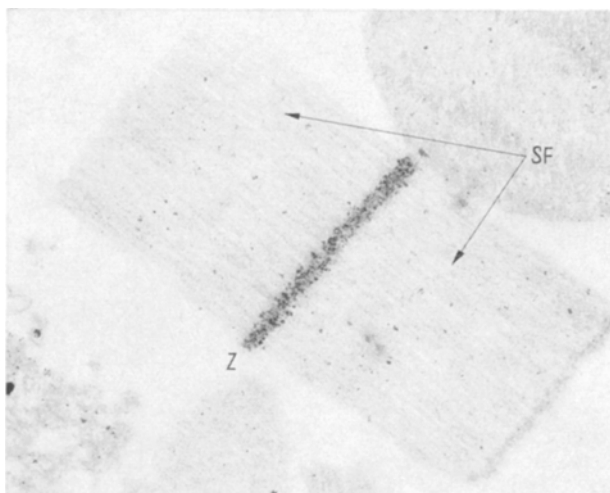
<sup>5</sup> A. G. WARRE, N. M. HILL et F. H. SCHULTZ, *Am. J. Physiol.* **149**, 657 (1947).

<sup>6</sup> L. ARIEL, F. W. BISHOP et S. L. WARREN, *Cancer Res.* **3**, 448 (1943).

### Zur Spaltung von Adenosintriphosphat durch die Z-Scheiben der indirekten Flugmuskeln von *Phormia regina* (Diptera)

In vorausgegangenen Veröffentlichungen wurde über Experimente zur Lokalisation ATP-spaltender Reaktionen in der Feinstruktur von Insektenflugmuskeln berichtet. Durch Fällung des enzymatisch freigesetzten anorganischen Phosphats mittels  $Pb^{++}$  liess sich dabei zeigen, dass die ATPase-Aktivität sowohl im A-Band als auch in der Z-Scheibe enthalten ist. Die ATP-Spaltung im A-Band konnte auf die Anwesenheit von Myosin in diesem Abschnitt zurückgeführt werden. Eine Deutung der in der Z-Scheibe lokalisierten Aktivität war dagegen nicht möglich. Versuche, die ATPase des A-Bandes und der Z-Scheibe getrennt voneinander zu demonstrieren, hatten nur teilweise Erfolg<sup>1,2</sup>.

In neuen Experimenten wurde nun versucht, das Myosin aus isolierten Myofibrillen quantitativ zu extrahieren, um auf diese Weise beide Enzyme einwandfrei voneinander zu trennen. Die für diesen Zweck gewöhnlich verwendeten Lösungen<sup>3,4</sup> erwiesen sich als unwirksam. Erst eine erhebliche Erhöhung der Ionenstärke führte zum gewünschten Ergebnis: 1,0 M KCl, 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,0, 0,01 M Na-Pyrophosphat, 0,001 M  $MgCl_2$ <sup>5</sup>. In diesem Gemisch lassen die Myofibrillen bereits nach wenigen min eine Steigerung des Kontrasts der vorher nur schwer erkennbaren Querstreifung beobachten. Die A-Banden hellen sich auf und nicht selten wird der Zentralabschnitt der Sarcomere völlig durchsichtig. Das ent-



Isolierte Z-Scheibe (Z) mit anhaftenden Sekundärfilamenten (SF) nach quantitativer Extraktion des Myosins (30 min mit dem 15-fachen Volumen bei 0°C, darauf 4mal je 15 min mit der gleichen Menge frischen Mediums). Der Niederschlag von Bleiphosphatkristalliten ist auf die Struktur der Z-Scheibe beschränkt.  $\times 31500$ .

<sup>1</sup> E. ZEBE und H. FALK, *Z. Naturforsch.* **18b**, 501 (1963).

<sup>2</sup> E. ZEBE und H. FALK, *Histochemie* **4**, 161 (1964).

<sup>3</sup> W. HASSELBACH und G. SCHNEIDER, *Biochem. Z.* **321**, 462 (1951).

<sup>4</sup> H. E. HUXLEY und J. HANSON, *Biochim. biophys. Acta* **23**, 229 (1957).