

When 3.6 mM calcium was added to 2% ethanol-Ringer's solution the frequency of m.e.p.p.s was about 2.5 times control, and was restored approximately to its original value after the further addition of 3.6 mM magnesium to the fluid (Figure 1). When the magnesium concentration was first increased the m.e.p.p. frequency was decreased. At a concentration of magnesium of 7.2 mM in the bathing 3% ethanol-Ringer's solution, the frequency of m.e.p.p.s was about 20% control and was restored to its approximate original value after the further addition of 7.2 mM calcium to the fluid (Figure 2).

It seems likely from these results that calcium and magnesium compete on a one-to-one basis in the mechanism of acetylcholine release from the nerve ending. But the one-to-one basis is formed only on these additional calcium and magnesium ions because Ringer's solution contains 1.8 mM calcium. The mechanism of antagonism of calcium and magnesium on the site related to acetylcholine release might be very complicated at the molecular level.

The results show clearly that calcium ions do have an effect on the frequency of m.e.p.p.s in amphibia just as in mammals, and that magnesium ions act as an antagonist to calcium ions in ethanol-Ringer's solution.

The reason why calcium and magnesium ions are effective on the frequency of m.e.p.p.s in ethanol but not in its absence is not known. It has been suggested that acetylcholine is liberated at the nerve terminal after calcium ions penetrate the cell terminal membrane.

When alcohol is added to the bathing fluid, the permeability of the nerve terminal might be increased. As a

result, the frequency of m.e.p.p.s would be increased because some calcium ions which could not penetrate the nerve terminal membrane in normal Ringer's solution are able to do so in the presence of alcohol and thus acetylcholine would be released from the terminal. The permeability to magnesium ions should also be increased in alcohol. Magnesium ions could penetrate the membrane to compete with calcium ions on the site related to acetylcholine. As a result, spontaneous activity is accelerated by the addition of calcium and depressed by the addition of magnesium⁶.

Zusammenfassung. Während bekanntlich Kalzium- und Magnesiumionen keinen Einfluss auf die Frequenz der Spontanrhythmik (m.e.p.p.) der Kaltblütermuskeln in der normalen Ringer-Lösung haben, konnte experimentell festgestellt werden, dass die Frequenz der Spontanrhythmik in einer Äthanol-Ringer-Lösung durch Zusatz von Kalziumionen vermehrt, von Magnesiumionen vermindert wird.

K. OKADA

Department of Physiology, Tottori University,
School of Medicine, Yonago (Japan),
5th December 1966.

⁶ I wish to thank Prof. G. B. FRANK (Department of Pharmacology, University of Alberta) for his advice and helpful discussion.

Le chondriome des hépatocytes en culture trypsinée au cours de la néoglucogénèse. Comportement de la glucose-6-phosphatase

Dans une précédente étude, nous avons montré (HÉBERT et MARCHI¹), que la forme des chondriosomes dans les hépatocytes en culture trypsinée variait suivant la richesse nutritive du milieu. Normalement, dans les cultures bien nourries, le chondriome se présente sous la forme granuleuse. NOËL² a montré que cet aspect, dans le lobule hépatique, s'observe au niveau de la zone périphérique et correspond à un état de fonctionnement actif. Dans les cultures plus âgées, dont le milieu s'appauvrit, les mitochondries se transforment progressivement en batonnets, image que NOËL a décrite dans la zone centrale du lobule et qui correspond à un état de repos.

Nous avons pu provoquer la transformation des mitochondries granuleuses en batonnets en diluant de moitié le milieu de culture habituel avec de la solution de Ringer. Le processus est rapide. On peut l'observer 5 h après que les cultures aient été placées dans le milieu dilué. L'appauvrissement expérimental du milieu de culture met les hépatocytes en état de fonctionnement ralenti et provoque la transformation de leur chondriome.

Nous nous sommes demandé si, en maintenant les hépatocytes en activité métabolique, nous pourrions empêcher cette transformation de se produire. Nous avons observé³ que l'addition au milieu de culture d'acides aminés glyco-formateurs, tels que le glycocolle et la sérine, provoquait dans les hépatocytes en culture, un

processus de néoglucogénèse. La charge en glycogène des hépatocytes augmente et peut se maintenir plusieurs jours, tandis que la teneur en glucose du milieu de culture augmente. Les hépatocytes sont ainsi maintenus en état de fonctionnement actif; d'une part en raison du processus biochimique qui caractérise la néoglucogénèse, en particulier le processus de désamination des acides aminés, d'autre part en raison de l'enrichissement du milieu en glucose.

Nous avons donc porté notre étude sur le chondriome d'hépatocytes cultivés dans un milieu additionné de glycocolle. Il s'agit toujours de cultures trypsinées de foie d'embryon de poulet de 8-9 jours réalisées en tubes de Leighton-Barski. Aux 2 ml de milieu de culture (Milieu 199 de l'Institut Pasteur et sérum de poulin) on ajoute 1 ou 2 gouttes d'une solution de 100 mg de glycocolle pour 5 ml de sérum physiologique. Les cultures sont examinées au bout de 24, 48 et 72 h. Après fixation adéquate, elles sont traitées par la réaction de l'acide périodique Schiff pour la mise en évidence du glycogène (avec contrôle par l'amylase), par la technique classique d'Altmann pour le chondriome. Enfin, nous avons procédé à la mise en évidence de la glucose-6-phosphatase par la réaction de Chiquoine.

¹ S. HÉBERT et N. MARCHI, C. r. Soc. Biol. 160, 62 (1966).

² R. NOËL, *Recherches histo-physiologiques sur la cellule hépatique des mammifères*, Thèse Sciences, Paris (1922).

³ J. VERNE et S. HÉBERT, C. r. Soc. Biol. 158, 1804 (1964).

En comparant les cultures au glycocolle où le glycogène est mis en évidence et celles, du même âge, où le chondriome est coloré, on constate que les éléments de ce chondriome gardent leur forme granuleuse, même sur les cultures de 48 et 72 h, alors que, sur des cultures témoins, la grande majorité des chondriosomes se présentent sous la forme de courts batonnets ou de mitochondries ovoïdes ou renflées.

Dans les cultures où le chondriome est coloré, les plages occupées par le glycogène apparaissent en clair et, de ce fait, le chondriome est moins abondant, comme dans les figures décrites par NOËL. Nous avons, assez rarement, observé quelques aspects de mitochondries ovoïdes.

De cette étude, il ressort donc que, dans les hépatocytes maintenus dans un état d'activité représenté par le processus de la néoglycogénèse, les éléments du chondriome conservent la forme granuleuse. Il est difficile d'apprécier si le chondriome participe à l'élaboration du glycogène, contrairement à l'opinion de NOËL, ou s'il est seulement en jeu dans les processus biochimiques qui se déroulent aux dépens du glycocolle.

Nous avons, parallèlement, recherché l'activité de la glucose-6-phosphatase dans des cultures témoins et dans des cultures en présence de glycocolle. La réaction, selon Chiquoine, est effectuée sur des cultures non fixées. Ces cultures sont mises en présence du substrat (solution de glucose-6-phosphate de sodium et solution de nitrate de plomb) pendant 20 h à pH 6,4. Nous avons reconnu la nécessité absolue de maintenir les cultures à basse température pendant l'incubation, dans un cristallisoir contenant de la glace. Si cette précaution n'est pas prise, le substrat ne pénètre pas dans le cytoplasme des hépatocytes. La réaction apparaît alors seulement à leur surface, en dessinant leurs contours. Les cultures sont ensuite rincées. La réaction est visualisée par l'action d'une solution très diluée de sulfure d'ammonium. Elle se manifeste sous forme de granulations brun-noir éparses dans tout

le cytoplasme. Sur les cultures témoins, la réaction est positive dans les hépatocytes. Elle est faible ou négative dans les hépatocytes des cultures en présence de glycocolle. Nous pensons que la réaction positive dans les cultures témoins est en rapport avec les processus de glycogénolyse. Au contraire, la réaction est faible ou nulle dans les hépatocytes qui sont le siège de la néoglycogénèse.

Conclusions. La forme granuleuse des mitochondries dans les hépatocytes correspond à un état d'activité. Ces éléments prennent la forme de batonnets, correspondant à un état de repos, dans un milieu de culture appauvri. Dans un milieu enrichi en glycocolle, les hépatocytes sont le siège d'un processus de néoglycogénèse. Leur chondriome demeure de ce fait actif et conserve l'aspect granuleux. Parallèlement, la réaction de la glucose-6-phosphatase, très forte dans les cultures témoins où se produit une glycogénolyse, devient faible ou disparaît dans les hépatocytes, où se déroule la néoglycogénèse.

Summary. In tissue culture, mitochondria have a round shape during the activity of liver cells. They become elongated in a resting state, with a poor medium. When glycocolle is added to the medium, neoglycogenesis is observed and mitochondria keep the round shape. Glucose-6-phosphatase reaction is very strong when glycogenolysis develops in liver cells. This reaction disappears or becomes weak during neoglycogenesis.

S. HÉBERT et J. VERNE
avec la collaboration de
N. MARCHI

Laboratoire de Cultures de Tissus, Institut d'Histo chimie Médicale, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Faculté de Médecine, 45 rue des Saints Pères, Paris 6^e (France), 21 novembre 1966.

Modification de métabolisme des ARN induites par l'adrénaline dans les cellules animales

On sait que simultanément à ses effets physiologiques, l'adrénaline induit de nombreuses transformations chimiques, plus spécialement une activation rapide de la glycolyse. Cependant plusieurs auteurs tels que KARLSON¹ et STENT² ont émis l'hypothèse que cette hormone pourrait intervenir comme inducteur dans un schéma de régulation tel que ceux proposés par JACOB et MONOD³. Puisque l'adrénaline entraîne une utilisation accélérée des réserves de glycogène, on peut supposer qu'elle augmente la vitesse de synthèse des protéines enzymatiques concernées, donc également la vitesse de transcription des ARN messagers correspondants.

Pour vérifier ce dernier point on a utilisé des foies de souris mâles adultes d'un poids moyen de 25 g. Les animaux sont tués par rupture des vertèbres cervicales; les foies sont prélevés immédiatement après, lavés au tampon *Tris* HCl 7,4 et mis en suspension dans une solution *Tris* HCl 7,4, $MgCl_2$, KCl (0,005 M; 0,0001 M; 0,1 M).

On ajoute du sodium dodécyl sulfate (S.D.S.) jusqu'à 0,01 % comme inhibiteur de RNase⁴. Sauf indication

contraire, toutes les opérations sont réalisées à un maximum de 4°C. Une solution radioactive d'orthophosphate (activité spécifique: 5mc/ml) ^{32}P a été employée comme précurseur de mARN. Chaque animal a reçu en injection i.p. 1,5 mc de ^{32}P . L'adrénaline a été solubilisée dans une solution à 96 %.

Dans un premier essai, on a laissé agir l'hormone 60 min à différentes doses, les animaux recevant une injection de ^{32}P 10 min avant d'être tués. Les foies sont homogénéisés par un mixer Virtis Hi-Speed 45 model 10200 durant 10 min et à basse vitesse. La suspension est alors centrifugée 20 min à 20000 g de façon à obtenir un surnageant post-mitochondrial; les structures polysomiales de ce dernier sont dissociées du reticulum endoplasmique par un traitement au déoxycholate de potassium. D'après

¹ P. KARLSON, in *Mechanisms of Hormone Action* (Ed. P. KARLSON; Academic Press, London 1965), p. 139.

² G. S. STENT, *Science* 144, 816 (1964).

³ F. JACOB et J. MONOD, in *Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis* (Ed. M. LOCKE; Academic Press, London 1963), p. 30.

⁴ C. CECITO (communication personnelle).