

first oocytes in leptotene stage of meiosis appear in the central part of the ovary of the quail embryo after 10 days of incubation (unpublished results). At the moment of hatching (approximately after 16 days incubation) the first intrafollicular oocytes are seen. Thus in our experimental conditions, oocytes of quail appear to perform their differentiation from one of the earliest stages of development to that of advanced previtellogenesis, corresponding to a very large cytoplasmic growth. This marvellously rapid development (one of the most accelerated among higher vertebrates), together with the possibility of direct application of chemical or physical agents on the pieces of ovaries, may be of great interest for investigations of oocyte metabolism. The present study also demonstrates that the vital potencies of the developed oocytes have not been irreversibly altered by the passage through organ culture, their extracorporal development being apparently independent of the physiological state of the much younger chick embryo on which they have been transplanted⁴.

Zusammenfassung. Stücke des Eierstocks von 10 oder 13 Tage alten Wachtelembryonen werden 5 oder 24 h in Organkultur gezüchtet und dann auf die Chorioallantois-membran 7 Tage alter Hühnchen übertragen. Nach elf-tägigem Wachstum beobachtet man eine Entwicklung von intrafollikulären Oozyten in Previtellogenese.

M. CALLEBAUT

Departement Radiobiologie, Studiecentrum voor Kernenergie, Mol (Belgium), 3 July 1968.

⁴ This work was carried out thanks to grants from the Belgian 'Fonds voor Fundamenteel Kollektief Wetenschappelijk Onderzoek'.

Action de la pepsine sur un flagelle du type «9 + 1»

MONNERON et BERNHARD¹ ont montré qu'une certaine action enzymatique spécifique est possible sur coupes de tissus inclus en milieu non hydrosoluble, tel que l'Epon, ce qui permet une localisation très précise du phénomène au niveau de la microscopie électronique. Plus récemment, GIVAN et coll.² ont réussi de faire agir la pepsine sur le capsid protéique de virus inclus dans un mélange d'Epon-Araldite.

Un essai d'extraction enzymatique a été effectué sur des flagelles du spermatozoïde de la planaire *Dugesia tigrina*, dans le but d'en identifier quelques propriétés de son cylindre central unique. Ces flagelles, comme chez d'autres espèces de Platyhelminthes, sont du type «9 + 1» et son ultrastructure pose des problèmes de dynamique bien intéressants. Une étude détaillée de ces flagelles sera présentée ailleurs³.

Nous avons utilisé la technique décrite par MONNERON et BERNHARD¹. Des exemplaires de *D. tigrina* sont fixés en tétroxyde d'osmium à 1% en tampon phosphate (Sörensen) pH 7,3 pendant 1 h, deshydratés dans l'alcool et l'oxyde de propylène et inclus en Epon⁴. Des coupes ultrafines sont obtenues avec un microtome Porter-Blum. Pour l'extraction enzymatique, les coupes sont préalablement oxydées pendant 20 min dans une solution à 10% d'acide périodique, lavées dans l'eau distillée et flottées dans une solution de pepsine (Sigma, 2 fois cristallisée) à 0,2%, pH 1,2 dans l'acide chlorhydrique 0,1M. La digestion est faite à 38°C pendant 30, 40 et 60 min. Les coupes traitées sont alors lavées dans l'eau distillée et recueillies sur des grilles dépourvues de membrane-support. Des coupes témoins sont procédées à la fois, et sous les mêmes conditions que celles traitées, excepté que l'incubation est faite dans une solution de chlorure de sodium à 0,2%. Toutes les coupes – traitées et témoins – sont alors contrastées pendant 15 min par immersion dans l'acétate d'uranyle, plus flottées 5 min dans le citrate de plomb, selon les procédés habituels. L'étude des coupes est faite dans l'Elmiskop I Siemens sous 80 kV.

Résultats. L'action de la pepsine est inefficace ou à peine perceptible pour 30 min d'exposition, comme le

montre la Figure 1; les flagelles (F) restent avec son structure normale, tel comme l'on voit aussi dans le témoin (Figure 2). Les éléments constitutifs d'un flagelle sont indiqués ici dans la coupe témoin: cylindre central (cc), fibrilles périphériques (fp) et rayons (r). Dans le cylindre central on peut reconnaître l'élément axial dense, circonqué par la zone intermédiaire (anneau clair) plus la gaine corticale (anneau dense). On voit aussi dans la Figure 2 une coupe transversale du corps du spermatozoïde, contenant noyau (N), mitochondrie (m) et système de microtubules (mt) sous la membrane plasmique.

À la suite de 40 min de contact, l'action de la pepsine est déjà bien marquée, comme l'on voit dans la Figure 3: autant que la membrane du flagelle soit assez résistante, les 9 paires périphériques se présentent bien altérées. Il arrive souvent que la pepsine agit sur l'Epon lui-même, causant des petits trous (flèches). Toutefois, le cylindre central et les rayons y associés sont encore nets. Une dilatation de la membrane flagellaire contenant des vésicules (v) est indiquée dans les Figures 3 et 4. Par comparaison avec son témoin (Figure 4), on observe une perte du contraste de la coupe traitée, surtout des fibrilles périphériques.

Au bout d'1 h, la digestion est fort poussée (Figure 5), et l'Epon se présente souvent déchiré. Bien que le témoin (Figure 6) soit maintenant un peu altéré, la comparaison avec la coupe traitée est remarquable: on observe ici, dans les 3 flagelles discernibles de la coupe, une désorganisation des éléments fibrillaires, qui forment un amas peu dense entouré par la membrane du flagelle. Dans le cylindre central, seulement la gaine corticale avec les rayons persiste encore reconnaissable (Figure 5, flèches).

¹ A. MONNERON et W. BERNHARD, *J. Microscopie* 5, 697 (1966).

² K. F. GIVAN, C. TURNBULL and A. M. JÉZÉQUEL, *J. Histochem. Cytochem.* 15, 688 (1967).

³ M. SILVEIRA, *J. Ultrastruct. Res.*, sous presse.

⁴ J. H. LUFT, *J. biophys. biochem. Cytol.* 9, 409 (1961).

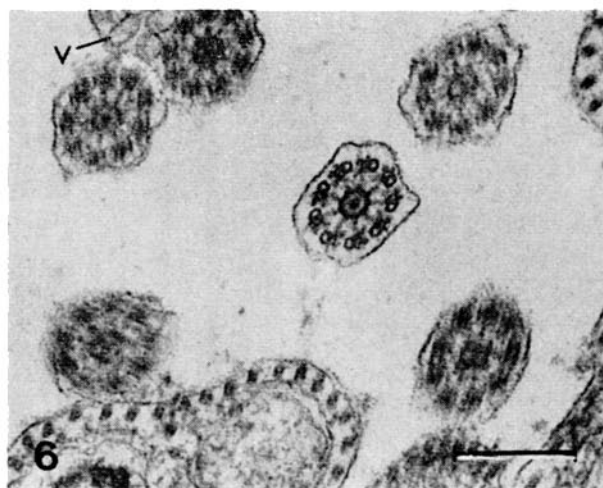
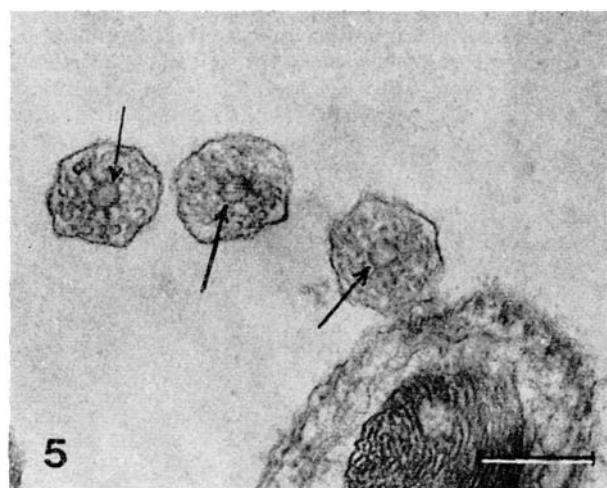
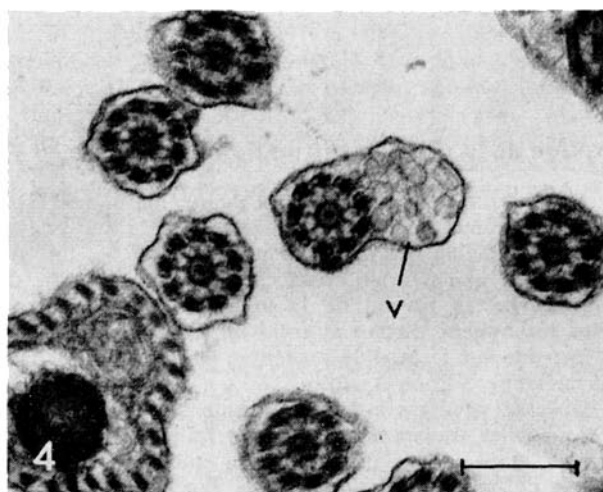
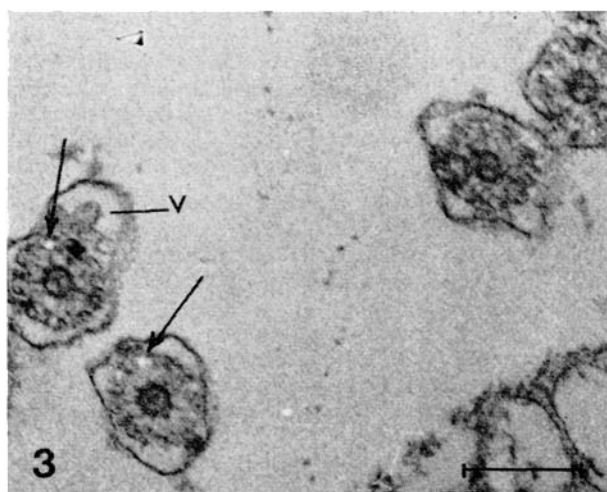
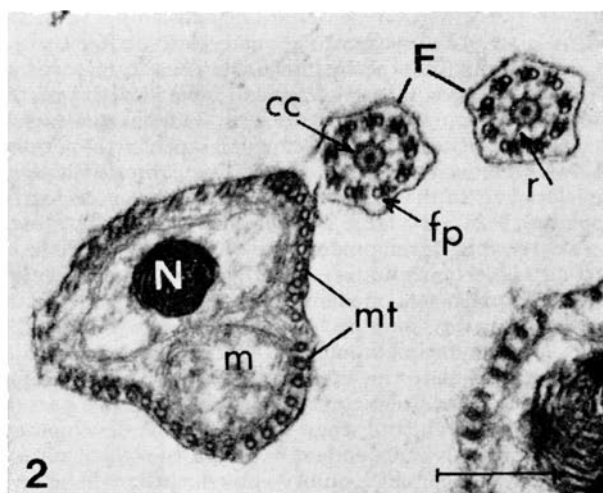
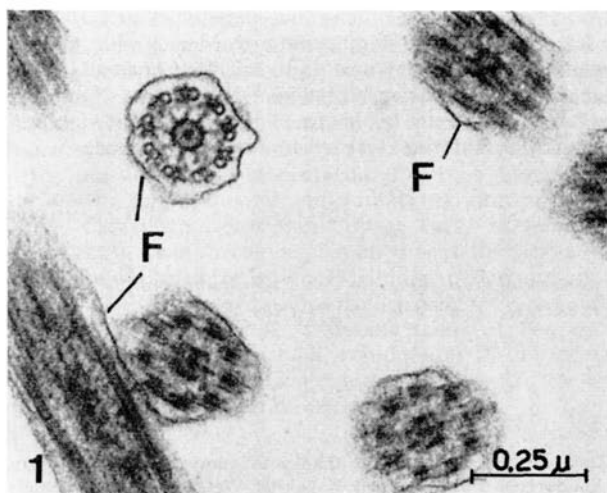


Fig. 1–6. Flagelles (F) traités par la pepsine pendant 30 min (Figure 1); pour 40 min (Figure 3) et pour 60 min (Figure 5). On observe une extraction progressive des fibrilles périphériques et de l'élément axial du cylindre central. Par contre, dans les coupes-témoins, les mêmes structures restent tout à fait inaltérées, soit après 30 min (Figure 2), 40 min (Figure 4) ou 60 min (Figure 6). Dans les fla-

gelles (F) on reconnaît: fibrilles périphériques (fp), cylindre central (cc) et rayons (r). Quelques flagelles ont des dilatations de la membrane contenant des vésicules (v). Aussi indiqués dans un spermatozoïde, le noyau (N), une mitochondrie (m) et système de microtubules (mt). $\times 60.000$.

Discussion. Après l'action de la pepsine, on constate une réduction générale du contraste de la préparation par rapport au témoin. Sur les coupes traitées il se produit une altération progressive et différentielle de certains éléments du flagelle; dans le spermatozoïde néanmoins, à l'exception du noyau, dont les altérations subies feront objet d'une étude ultérieure, les autres éléments cellulaires ne sont pas sensiblement touchés.

Dans le cylindre central du flagelle, une distinction semble exister entre l'élément dense axial le plus sensible de tous à l'action enzymatique, et la gaine corticale, la plus résistante. Les rayons semblent être associés intimement avec celle-ci, puisqu'ils y restent toujours liés et ont la même résistance et densité, tel que le suggèrent aussi d'autres études par microscopie électronique³. Rien ne peut être déduit à l'égard de la zone intermédiaire du cylindre, car elle n'est pas contrastée par l'acétate d'uranyle et le plomb³.

Dès que la pepsine a une action très spécifique sous les conditions utilisées ici¹, il est possible d'affirmer que l'élément axial du cylindre central du flagelle «9 + 1» et les fibrilles périphériques sont de nature protéique, ce qui est d'accord avec les résultats de GIBBONS⁵ et de RENAUD et coll.⁶ pour les fibrilles isolées des cils de *Tetrahymena*. D'autres études sont encore nécessaires pour déceler la nature de la gaine corticale de ce flagelle et des rayons qui restent presque insensibles au traitement utilisé. BURTON⁷ a aussi noté pour le trématode *Haematoloechus* une plus grande résistance du cylindre central que des autres éléments du flagelle, vers le mercaptoéthanol, la colchicine et l'urée.

Bien qu'une certaine similitude morphologique soit évidente entre fibrilles périphériques du flagelle et micro-

tubules du corps de la cellule⁸, l'action variable de la pepsine indique que d'autres différences existent entre ces 2 constituants⁹.

Summary. Enzymatic extraction with pepsin was carried out on ultrathin sections of the '9 + 1' flagella of *Dugesia tigrina*, using the method of MONNERON and BERNHARD. The 9 peripheral fibrils and the axial zone of its unique central cylinder become altered within 40 min exposure; following 1 h of incubation these same elements are badly damaged, whereas the cortical sheath and associated radial spokes remain fairly well preserved inside the flagellar membrane. Control sections do not show any sensible alteration. The protein nature of peripheral doublets and axial element of the central cylinder seems therefore indicated; the cortical sheath and the spokes have a very similar, if not identical nature, though their chemical constitution still remains to be investigated.

MARINA SILVEIRA

*Centro de Microscopia Eletrônica,
Escola Politécnica, Universidade de
São Paulo (Brasil), 18 juin 1968.*

⁵ I. R. GIBBONS, Archs Biol., Liège 76, 317 (1965).

⁶ F. L. RENAUD, A. J. ROWE and I. R. GIBBONS, J. Cell Biol. 36, 79 (1968).

⁷ P. R. BURTON, J. Cell Biol. 35, 162 A (1967).

⁸ M. SILVEIRA and K. R. PORTER, Protoplasma 59, 240 (1964).

⁹ Remerciements. Nous tenons à remercier le Prof. W. S. SASSO pour un don de pepsine. - Travail effectué avec l'aide de la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

On the Association Between Lysogeny and Carcinogenicity in Nitroquinolines and Related Compounds

Since the demonstration of phage induction in bacteria by LWOFF^{1,2}, lysogeny, i.e. induced lysis in bacteria carrying an ordinarily harmless temperate phage, has been shown to be associated with radiomimetic and anti-tumor activities^{3,4}. Interruption of DNA synthesis appears prerequisite for inducing activity⁵. Phage induction has been demonstrated for 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO), a potent water soluble carcinogen, and its reduction product and the presumed proximate carcinogen, 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (4-HAQO)⁶, whose properties also include mutagenicity⁷, DNA binding^{8,9}, production of high toxicity¹⁰, malignant transformation¹¹, nuclear inclusions¹² and chromosomal aberrations¹³ in cultured mammalian cells; 4-NQO is also photodynamically active¹⁴. We report here the results of lysogenic tests in a series of nitroquinolines and related compounds of known carcinogenicity.

A series of 16 nitroquinolines and hydroxyaminoquinolines, of known carcinogenicity and photodynamic activity¹⁴ (Table), were tested from fresh stock solutions in acetone or 95% alcohol, at concentrations ranging from 100–0.1 µg/ml. Stock cultures of *Escherichia coli* C-600 (λ) and C-600, the lysogenic and indicator strains respectively, were cultured for 24 h at 37°C on nutrient agar slants and then maintained for 1 week at 4°C. *E. coli* C-600 (λ) cultures were incubated, in 250-ml flasks containing

100 ml of nutrient broth, for 18 h on a shaker (45 rpm) at 37°C, washed twice and resuspended in nutrient broth to give an O.D. of 0.2 at 625 nm. Compounds in 0.1 ml volume were added to 0.9 ml cell suspension in screw cap

¹ A. LWOFF, Bact. Rev. 17, 269 (1950).

² A. LWOFF, L. SIMONOVITCH and N. KJELGAARD, Annls Inst. Pasteur, Paris 79, 815 (1959).

³ J. LEIN, B. HEINEMANN and A. GOUREVITCH, Nature 196, 783 (1962).

⁴ H. ENDO, M. ISHIZAWA, T. KAMIYA and S. SONODA, Nature 198, 258 (1963).

⁵ M. F. MALKIN and A. J. HOWARD, Antimicrob. Ag. Chemother. 126 (1964).

⁶ H. ENDO, M. ISHIZAWA and T. KAMIYA, Nature 198, 195 (1963).

⁷ T. OKABAYASHI, M. IDE, A. YOSHIMOTO and M. OTSUBO, Chem. pharm. Bull., Tokyo 13, 610 (1965).

⁸ C. NAGATA, M. KODAMA, Y. TAGASHIRA and A. IMAMURA, Biopolymers 4, 409 (1966).

⁹ M. F. MALKIN and A. C. ZAHALSKY, Science 154, 1665 (1966).

¹⁰ A. C. ZAHALSKY, M. M. KEANE, S. H. HUTNER, K. J. LUBART, M. KITTRELL and D. AMSTERDAM, J. Protozool. 10, 421 (1963).

¹¹ H. SATO and T. KUROKI, Proc. Japan Acad. 42, 1211 (1966).

¹² T. MITA, R. TOKUZEN, F. FUKUOKA and W. NAKAHARA, Gann 56, 293 (1965).

¹³ T. YOSHIDA, K. KURITA and K. MORIWAKI, Gann 56, 523 (1965).

¹⁴ C. NAGATA, K. FUJII and S. S. EPSTEIN, Nature 215, 972 (1967).