

Our results are in agreement with those of HOUSSAY³, FOGLIA, SCHUSTER and RODRIGUEZ⁴, LEWIS, FOGLIA and RODRIGUEZ⁵, and RODRIGUEZ⁶. These authors demonstrated that the incidence of diabetes in the rat, produced by subtotal pancreatectomy is much higher in males than in females. They also reported that estrogens conferred marked protective effect in their diabetic animals, while castration of male rats only slightly reduced the incidence.

It has been theorized that the protective effect of estrogens could be either the result of altered food intake, a direct effect on the islets, an action mediated through the pituitary gland and adrenals or an indirect effect on the peripheral carbohydrate metabolism. HOUSSAY and co-workers critically examined the role of these factors^{3,6} and by forced and paired feeding ruled out a principal role of altered food intake. It was also shown by adrenalectomy that this gland does not play an essential role. Furthermore, no strict correlation was found between protective action and pituitary enlargement. Although the role of the peripheral carbohydrate metabolism has not been clarified fully, HOUSSAY and RODRIGUEZ concluded that the protection is chiefly due to direct effect on the islets. Whether in our experiment the lower incidence of islet change in the course of estrogen treatment is due to a correction of certain abnormal metabolic conditions in mature and old male rats or a direct effect on the pancreatic islets or both remains to be seen. Although in our previous work no correlation was found between inflammatory (immunological?) changes (insulinitis, peri-insulinitis) and islet fibrosis, a suppressive action of estrogen on these processes cannot be ruled out^{7,8}.

Zusammenfassung. Die bei alternden männlichen Sprague-Dawley-Ratten auftretende spontane Fibrose und Vergrößerung der Langerhansschen Inseln kann durch eine im Alter von 20 Wochen eingeleitete Östrogenbehandlung verhindert werden. Diese Schutzwirkung der Östrogene kann Ausdruck eines direkten Einflusses auf die Inseln oder eines indirekten Einflusses durch den peripheren Kohlehydratstoffwechsel sein. Eine Kastration vermochte diese Veränderungen an den Inseln nur wenig zu verhindern.

A. HAJDU, G. RONA and F. HERR

Ayerst Research Laboratories and Department of Pathology, McGill University, Montreal (Canada), 26 August 1968.

³ B. A. HOUSSAY, Br. med. J. 2, 4730 (1951).

⁴ V. G. FOGLIA, N. SCHUSTER and R. R. RODRIGUEZ, Endocrinology 41, 428 (1947).

⁵ J. T. LEWIS, V. G. FOGLIA and R. R. RODRIGUEZ, Endocrinology 46, 111 (1949-1950).

⁶ R. R. RODRIGUEZ, in *On the Nature and Treatment of Diabetes* (Ed. B. S. LEIBEL and G. A. WRENSHALL; Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1965), p. 288.

⁷ A. KAPPAS, H. E. H. JONES and T. M. ROITT, Nature 198, 902 (1963).

⁸ P. TOIVANEN, K. MÄÄTTÄ, R. SUOLANEN and R. TYKKYLÄINEN, Med. pharmac. exp. 17, 33 (1967).

Fractionnement des protéines bactériennes par électrophorèse en gel d'acrylamide-agarose

Nous nous sommes proposés de fractionner par électrophorèse en gel d'acrylamide-agarose les protéines endocellulaires libérées par désintégration sonique de divers bacilles Gram négatifs.

Matériel et méthode. 15 souches bactériennes appartenant aux espèces suivantes: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes denitrificans*, sont cultivées à la température de 37°C dans un milieu à base de peptone pancréatique de caséine et d'extrait de viande (Difco).

Les bactéries sont recueillies soit après 18 h de culture, soit au cours d'une phase définie de la croissance¹: phase exponentielle, phase maximum stationnaire.

L'extraction des protéines bactériennes s'effectue en tampon Tris-glycine pH 8,7 à l'aide d'un insonateur Sonifier S 125. L'électrophorèse en gel d'acrylamide-agarose est réalisée selon la méthode d'URIEL² avec les modalités suivantes: tampon discontinu Tris-glycine pH 8,7; différence de potentiel 6,7 V/cm; traces de noir amide dans le réservoir pour contrôler la longueur de migration; durée d'électrophorèse: 30 min à 4 h 30; fixation et coloration des protéines par le noir amide en solution acétique.

Résultats. Comme le montre la Figure 1, les séparations électrophorétiques diffèrent selon les concentrations en acrylamide utilisées, chacune présentant des caractéristiques qui lui sont propres. Les séparations les meilleures et les plus reproductibles ont été généralement obtenues avec les concentrations en acrylamide de 5 et 7%.

La qualité des séparations et le dénombrement des fractions dépendent de la concentration finale en pro-

téines et de la longueur de migration – d'où la nécessité d'étudier une souche bactérienne en faisant varier ces différents paramètres. Dans les conditions habituellement utilisées la concentration finale en protéines a été de 2 mg/ml et la longueur de migration du noir amide de 10-12 cm.

A pH 8,7 la plupart des protéines bactériennes se dirigent vers l'anode, mais certaines d'entr'elles migrent vers la cathode. Une trentaine de fractions peuvent être ainsi distinguées. La mobilité relative de chaque fraction peut s'exprimer par rapport à la distance parcourue par le noir amide. La mobilité, le nombre et la répartition des fractions diffèrent selon l'espèce bactérienne étudiée. La Figure 2 montre à titre d'exemple, le fractionnement obtenu avec divers bacilles Gram négatifs. On remarque notamment que l'électrophorégramme d'*Alcaligenes denitrificans* présente 5 fractions migrant vers le pôle négatif.

Des variations s'observent également selon la phase de croissance considérée. Les Figures 3 et 4 permettent de comparer les distributions électrophorétiques obtenues avec la même souche de *Proteus vulgaris* en phase exponentielle et en début de phase stationnaire. La Figure 3 montre les différences observées dans les conditions habituelles d'électrophorèse. La Figure 4 correspond à une durée d'électrophorèse de 40 min; on révèle ainsi l'exis-

¹ J. MONOD, *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes* (Hermann et Cie., Paris 1942).

² J. URIEL, Bull. Soc. Chim. biol. 48, 969 (1966).

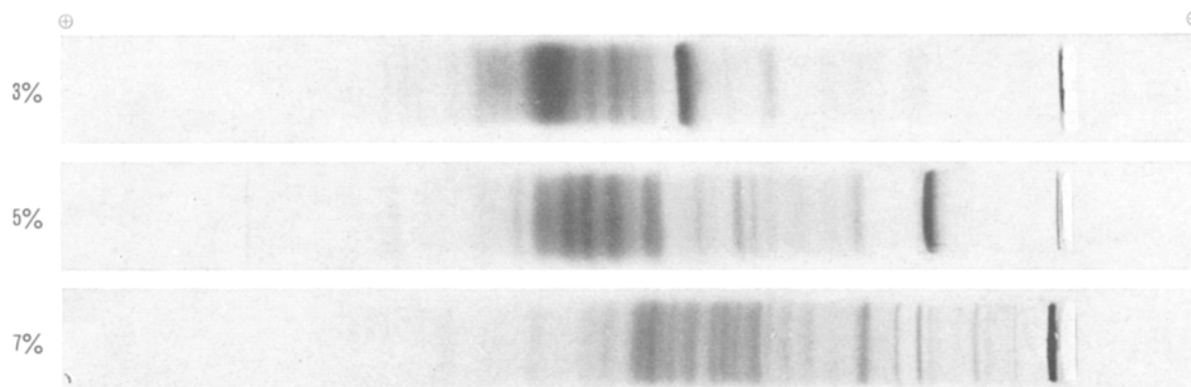


Fig. 1. Fractionnement obtenu à différentes concentrations d'acrylamide: 3, 5 et 7%. Culture de *Serratia* (18 h). (Concentration finale en protéines: 2 mg/ml; distance parcourue par le noir amide: 10 cm.)

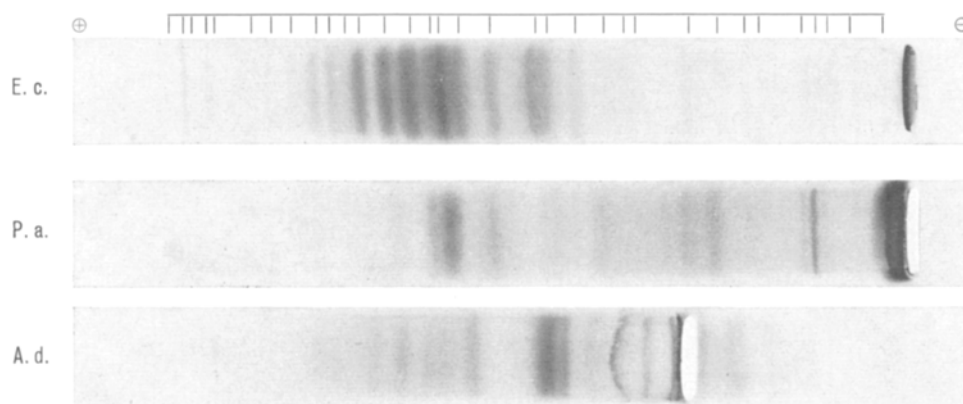


Fig. 2. Fractionnement des protéines extraites de divers bacilles Gram négatif (culture de 18 h). E. c., *Escherichia coli*; P. a., *Pseudomonas aeruginosa*; A. d., *Alcaligenes denitrificans*. (Concentration en acrylamide: 7%; concentration finale en protéines: 2 mg/ml; distance parcourue par le noir amide: 10 cm.)

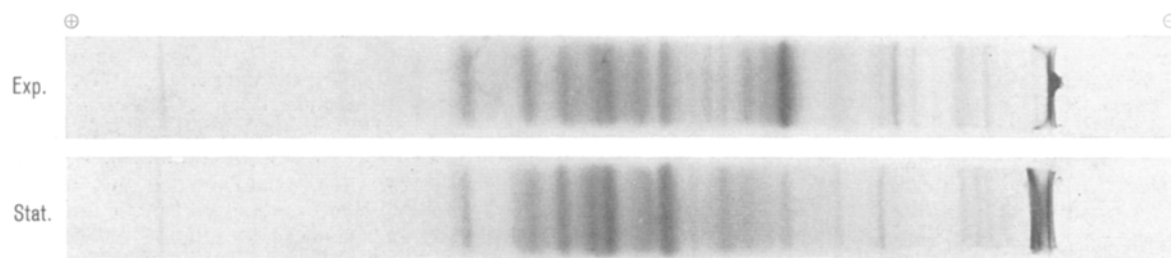


Fig. 3

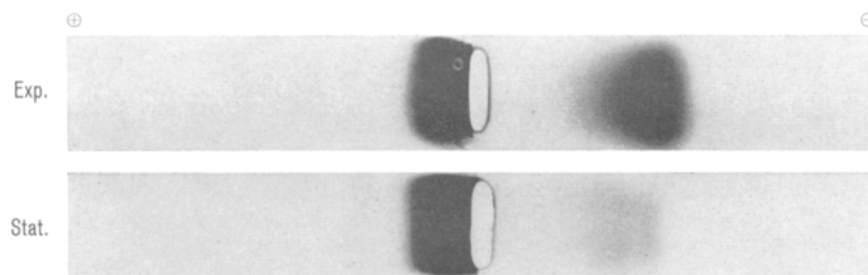


Fig. 4

Figs. 3 et 4. Electrophorogrammes des protéines de *Proteus vulgaris*. Exp., phase exponentielle; Stat., phase stationnaire. Fig. 3. Migrations obtenues dans les conditions habituelles d'électrophorèse. Fig. 4. Migrations obtenues après seulement 40 min d'électrophorèse (distance parcourue par le noir amide: 1,5 cm; concentration en protéines: 4 mg/ml).

tence d'une fraction qui migre rapidement vers la cathode et qui se manifeste principalement au cours de la phase exponentielle. Les caractéristiques de cette fraction laissent suggérer une composition chimique et un rôle physiologique assez particuliers. L'existence de fractions semblables a également été observée à partir d'autres préparations d'entérobactéries.

Discussion. Divers procédés de fractionnement électrophorétique des protéines endocellulaires ont déjà été proposés pour la différenciation et la taxonomie des micro-organismes³⁻¹¹.

Les résultats rapportés dans le présent travail montrent les possibilités analytiques de l'acrylamide-agarose et son intérêt non seulement pour la taxonomie mais aussi pour l'exploration de la synthèse des protéines bactériennes.

Le fractionnement électrophorétique pouvant être rendu plus spécifique ou plus sensible par l'emploi de réactions enzymatiques ou immunologiques, il sera possible de préciser la nature et la signification physiologique des diverses fractions obtenues, et d'étudier les variations des distributions électrophorétiques en fonction des conditions de culture ou des modifications du génome bactérien.

Summary. Acrylamide-agarose gel electrophoresis was employed to separate proteins obtained by sonication of

various gram negative bacilli. The bulk of bacterial protein migrate at pH 8.7 to the anode, but often some fractions are quickly migrating to the cathode. Some 30 fractions can be distinguished this way. This technique proves interesting for the study of microbial protein metabolism and may easily be applied to numerous bacteria.

PH. GOULLET
avec la collaboration technique
de O. JEANNEQUIN et C. GAILLARD

*Faculté de Médecine, Chaire de Microbiologie,
Paris 6^e (France), 9 juillet 1968.*

³ L. O. CHANG, A. M. SRB et F. C. STEWARD, *Nature* 193, 756 (1962).

⁴ R. C. FOWLER, D. W. COBLE, N. C. KRAMER et T. BROWN, *J. Bact.* 86, 1145 (1963).

⁵ J. R. NORRIS, *J. appl. Bact.* 27, 439 (1964).

⁶ D. C. CANN et M. E. WILLOX, *J. appl. Bact.* 28, 165 (1965).

⁷ B. M. LUND, *J. gen. Microbiol.* 40, 413 (1965).

⁸ D. GOTTLIEB et P. M. HEPDEN, *J. gen. Microbiol.* 44, 95 (1966).

⁹ C. A. WILLIAMS et E. L. TATUM, *J. gen. Microbiol.* 44, 59 (1966).

¹⁰ B. M. LUND, *J. gen. Microbiol.* 49, 67 (1967).

¹¹ R. A. D. WILLIAMS et E. BOWDEN, *J. gen. Microbiol.* 50, 329 (1968).

Gibberellin-Sugar Interaction Regulating the Growth Habit of Bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L) Pers.)

Little evidence is available on the role played by hormonal and nutritional factors in the plagiotropic¹ responses of rhizomes and stolons of grasses. Existing reports², however, suggest that a balance between the levels of auxins, gibberellins and cytokinins in the plant are of importance in the growth habit of diageotropic organs.

In this connection, this laboratory has recently reported³ that gibberellic acid (GA₃) induced the upward curvature of horizontally growing stolons of bermudagrass (*Cynodon dactylon*). This was obtained either by spraying the parent plant or by immersing the stolon tips in GA₃ solutions. Moreover, it was shown that this can also be studied by using 'explants' consisting of apical pieces of stolons, 10 cm long.

Further experiments established that a daily spray of 100 mg/l GA₃ to plants growing in the field provoked the same response on the horizontally growing rhizomes, i.e. diageotropic rhizomes and stolons both became orthotropic.

In searching for the mechanism regulating the horizontal growth habit of bermudagrass stolons, evidence was found that the liminal position of this organ might be determined by the balance between gibberellins and sugars within the plant.

Much of this work will be published elsewhere⁴ but the brief description of the main experiments which furnished the evidence for this assumption is given here.

Apical pieces of stolons prepared as previously described³ (Figure 1) were placed horizontally on wet sand in a growth chamber (26 ± 1°) under continuous illumination of about 300 foot-candle from fluorescent lamps (Gro-Lux, Sylvania), appropriate for inducing upward curvatures of the nodes. Cut ends of explants were introduced into 10-ml flasks containing distilled water (control) or the test solutions containing hormones and/or sugars.

All the solutions were prepared with glass distilled water and renewed every 12 h. 10 explants/treatment were used. The significance of the differences between the control and the treatments were statistically evaluated by the Student's *t*-test, previous proof that the standard deviation were similar.

Figure 2 depicts the angles attained by the tips with reference to an horizontal line in the different treatments after 72 h. A significant inhibition of the upward curvature caused by 7 and 10% sucrose can be observed as compared with the control. Similar responses were obtained with 5% glucose. The effect of sucrose was completely overcome by 50 mg/l GA₃, while in contrast, indolacetic acid (IAA) from 0.001–30 mg/l had no effect whatsoever.

In order to determine whether the inhibition was simply due to an osmotic effect of the sugars, polyethylene glycol 6000 and mannitol solutions of identical or higher osmotic pressures were tested but neither of them showed the inhibitory action of the sugars.

The full meaning of these results cannot yet be evaluated with certainty. However, it appears reasonable to assume

¹ Plagiotropic: geotropism by which the plant part orients its axis at an angle to the plumb line. Diageotropic: The special case of plagiotropism in which the organ orients itself in the horizontal direction. Orthotropic: direction of the axis parallel to the plumb line. Liminal direction: orientation which can be maintained by a plant organ for prolonged periods of time without carrying out geotropic movements. See P. LARSEN, *Handb. PlPhysiol.* 17, 34 (1962).

² P. F. WAREING, *Proc. 7th Br. Weed Control Conf.* 3, 1020 (1964).

³ E. R. MONTALDI, *Revista Investigaciones Agropecuarias*, Buenos Aires, Serie 2, *Biología y Producción Vegetal* 4, 55 (1967).

⁴ *Revista Investigaciones Agropecuarias*, Buenos Aires, Serie 2, *Biología y Producción Vegetal*.