

results of treatment with thiols of a large number of samples.

Theoretically this comparative immunodiffusion concept may be applied for the detection of molecular size differences between any proteins able to be precipitated by the same antiserum. In Figure 5 is shown the study through this test of a control and a papain-digested solution of IgG. Not only the increased diffusibility of the digest products but the difference in diffusion rate between Fab and Fc fragments are shown.²³

Résumé. Des différences dans les dimensions moléculaires de protéines possédant des spécificités antigéniques communes sont traduites par des différences dans la diffusion en gels d'agarose. Ces différences sont facilement mises en évidence par un test de double immunodiffusion

en gel d'agarose, en employant un arrangement spécial des échantillons antigéniques et de l'antiserum.

G. VIRELLA²⁴

*Department of Experimental Pathology,
University of Birmingham,
Birmingham 15 (England), 6 June 1969.*

²³ Acknowledgments. The author wishes to express his gratitude to Dr. R. A. THOMPSON and to Professor K. W. WALTON for their great interest and advice during this work and the preparation of its manuscript. The author is a recipient of a research scholarship from the Calouste Gulbenkian Foundation, Lisbon (Portugal).

²⁴ Present address: National Institute for Medical Research, Immunology Division, London N. W. 7 (England).

Electron-Microscopic Study of Antibody-Producing (Plaque-Forming) Spleen Cells of the Tortoise *Agrionemys horsfieldi* Gray

In the past few years the hemolytic plaque technique has been adapted to electron-microscopy, thus providing a possibility to study the ultrastructure of antibody-forming cells¹⁻⁴. So far antibody-producing cells of poikilothermic vertebrates have not been subjected to ultra-structural analysis. The technique, originally described for mammalian cells, was used to study spleen cells of the tortoise. The kinetics of both antibody formation⁵⁻⁹ and the production of plaque-forming cells¹⁰ in the tortoise have been described recently. These cells of *Agrionemys* (Testudo) *horsfieldi* Gray have an average diameter of 10 μ m and an eccentric nucleus.

The ultra-structure of plaque-forming cells of the tortoise shows great variation. Some cells have a comparatively primitive cytoplasmic morphology with a slightly developed endoplasmic reticulum, numerous ribosomes, while only few adhere to the endoplasmic reticulum, and an almost spherical nucleus (Figure 1). In

all types of plaque-forming cells there are some large mitochondria. In cells most frequently observed, an endoplasmic reticulum with typically extended cisterns may be noted. The nucleus has an irregular shape (Figure 2). There are intermediate stages between these 2 cell-types. Up to today no antibody-producing cell with the characteristically layered ergastoplasm of the

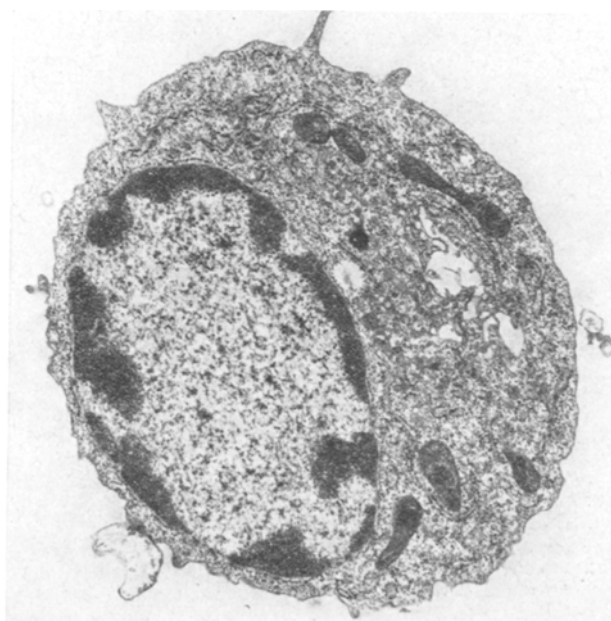


Fig. 1. A plaque-forming cell of tortoise with a comparatively primitive morphology of cytoplasm. $\times 20,000$.

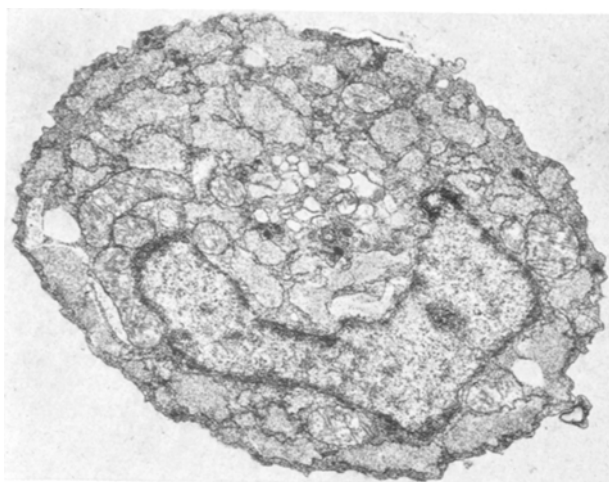


Fig. 2. An antibody-producing cell of tortoise with extended endoplasmic cisterns. $\times 20,000$.

¹ A. E. BUSSARD and J. L. BISSET, *Nature* 205, 676 (1965).

² F. W. FITCH, D. A. ROWLEY and S. COUTHARD, *Nature* 207, 994 (1965).

³ K. HUMMELER, T. N. HARRIS and N. TOMASSINI, *J. exp. Med.* 124, 255 (1966).

⁴ G. H. NEHER and B. V. SIEGEL, *Vox Sang.* 14, 63 (1968).

⁵ H. AMBROSIOUS, *Z. Immunforsch. exp. Ther.* 130, 41 (1966).

⁶ H. AMBROSIOUS and R. LEHMANN, *Z. Immunforsch. exp. Ther.* 128, 81 (1965).

⁷ H. M. GREY, in *Phylogeny of Immunity* (Ed. R. I. SMITH, P. A. MIESCHER and R. A. GOOD; Univ. Florida Press, Gainesville (1966), p. 227.

⁸ J. J. LYKAKIS, *Immunol.* 14, 799 (1968).

⁹ R. T. MAUNG, *J. Path. Bact.* 85, 51 (1963).

¹⁰ F. ROTHE and H. AMBROSIOUS, *Acta biol. med. germ.* 21, 525 (1968).

typical plasma cell of mammals could be found in the tortoise. It may therefore be assumed that the antibody-forming cell of the tortoise is a more primitive cell than the plasma cell of mammals. Since in the evolutionary scale, mammals have developed from reptiles, the above described types of plaque-forming cells of the tortoise may be considered to represent phylogenetic precursors of plasma cells.

Zusammenfassung. Antikörper produzierende («Plaque» bildende) Milzzellen von Schildkröten (*Agrionemys hors-*

fieldi Gray), die mit Hammelerythrozyten immunisiert worden waren, wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Die Feinstruktur dieser Zellen deutet darauf hin, dass es sich um einen Zelltyp handelt, der als phylogenetischer Vorläufer der Plasmazellen von Säugetieren angesehen werden kann.

H. AMBROSIOUS and G. HOHEISEL

Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität, 701 Leipzig (DDR), 26 June 1969

Etude immunochimique et électrophorétique de la conidiation de *Neurospora crassa*

La conidiation de *Neurospora crassa*, utilisée comme modèle de différenciation cellulaire, a été étudiée sous différents angles: ultrastructural¹⁻³, métabolique⁴ et génétique⁵. L'approche immunochimique n'a été que rarement utilisée, soit par la technique d'agglutination⁶, soit avec un critère majeur d'ordre phylétique⁷. Pourtant une telle méthode devrait pouvoir fournir, comme il a été démontré surtout en morphogénèse des Myxomycètes⁸ et des animaux⁹, un moyen sensible de détection des changements macromoléculaires spécifiques devant accompagner nécessairement la différenciation cellulaire et, dans le cas particulier, la différenciation conidienne. Parmi les macromolécules antigéniques impliquées dans un tel processus, les protéines apparaissent comme les plus importantes; il était donc intéressant d'entreprendre, parallèlement à l'immunoélectrophorèse, une étude analytique des protéinogrammes après séparation électrophorétique sur gel d'acrylamide.

N. crassa offre l'avantage de présenter, en plus de son type sauvage normalement conidiogène, plusieurs souches mutantes à conidiation déficiente. Dans cette première étude, nous nous sommes limités à la comparaison de la souche sauvage Lindegren A (Nc⁺) et du mutant «amyc» (No 305 A, Fungal Genetics Stock Center, Dartmouth College, Hanover, N.H., USA), intéressant parce qu'incapable de séparer des éléments conidiens libres (aschizogénie¹⁰). Ces souches ont été cultivées 96 h à 27°C en milieu liquide agité P de WESTERGAARD et MITCHELL¹¹ contenant 2% de saccharose (milieu Ps). Les gâteaux mycéliens récoltés et lyophilisés ont été broyés dans du tampon phosphates (selon Sørensen, pH 7,2) en présence de sable de quartz dans un mortier refroidi. Après centrifugation de l'homogénat à 10 000 g, le surnageant a constitué notre mosaïque antigénique soluble.

Pour l'aspect immunochimique, nous avons produit des antisérums par injections répétées à des lapins de composants solubles cytoplasmiques, extraits soit du type sauvage soit du mutant, selon la méthode décrite ci-dessus.

L'analyse immunoélectrophorétique des extraits antigéniques révélés par les antisérums homologues nous a donné des diagrammes caractéristiques de chaque souche (Figure 1, a et b). La structure des antigènes de *N. crassa* sauvage, appréciée sur la même lame par les immunosérums homologues et hétérologues anti-«amyc» en réaction croisée, est illustrée dans la Figure 1c.

Les identités et les différences antigéniques entre souche conidienne sauvage et souche mutante ont été mises en évidence par le sérum homologue absorbé par l'antigène «amyc» (voir arc différentiel, Figure 1d). Avec

une telle absorption, un seul composant spécifique a été isolé pour la souche conidienne. Il s'agit d'un constituant légèrement basique, déjà nettement détectable dans le diagramme global comparatif (Figure 1c) parce qu'il était le seul situé exactement dans cette même position légèrement cathodique, sans trouver de correspondant dans les arcs de précipitation de l'«amyc».

Le mutant «amyc» a récemment pu être induit à conidiation sur un milieu oxydatif optimum¹², comprenant l'acétate et le succinate comme sources de C (milieu Pa+su). Il était dès lors intéressant de rechercher si, parallèlement à la restauration de la fonction conidiogène, l'arc de précipitation dû à l'antigène caractéristique de la souche sauvage conidiogène réapparaissait.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué la réaction hétérologue entre les extraits d'«amyc» guéri sur acétate+succinate et le sérum de la souche sauvage contenant l'anticorps spécifique mis en évidence plus haut. Cette réaction nous a effectivement permis de retrouver l'arc de précipitation caractéristique de la souche sauvage conidiogène (Figure 1e). Nous pouvons dès lors penser que cet arc caractéristique de la souche sauvage et qui accompagne la restauration de la capacité conidiogène chez le mutant considéré, représente un composant antigénique impliqué dans la différenciation des macroconidies de *Neurospora*.

Le test positif de dénaturation thermique (60°C) des extraits antigéniques, suggérant la nature protéinique de l'antigène différentiel, nous a engagés à entreprendre

¹ B. WEISS, J. gen. Microbiol. 39, 85 (1965).

² B. WEISS et G. TURIAN, J. gen. Microbiol. 44, 407 (1966).

³ R. J. LOWRY, T. L. DURKEE et A. S. SUSSMAN, J. Bact. 94, 1757 (1967).

⁴ N. OULEVEY-MATIKIAN et G. TURIAN, Arch. Mikrobiol. 60, 35 (1968).

⁵ G. W. GRIGG, J. gen. Microbiol. 22, 662 (1960).

⁶ J. V. SPÄRCK, C. r. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. 26, 21 (1955).

⁷ C. A. WILLIAMS et E. L. TATUM, J. gen. Microbiol. 44, 59 (1966).

⁸ J. H. GREGG, dans *The Fungi II* (Ed. G. C. AINSWORTH et A. S. SUSSMAN; Academic Press, New York and London 1966).

⁹ E. WOLFF, P. GRABAR, S. RANZI et Y. CROISILLE, dans *New Methods in Embryology* (Hermann, Paris 1964).

¹⁰ G. TURIAN et N. OULEVEY, Experientia 24, 733 (1968).

¹¹ M. WESTERGAARD et H. K. MITCHELL, Am. J. Bot. 34, 573 (1947).

¹² W. J. DICKER, N. OULEVEY et G. TURIAN, Arch. Mikrobiol. 65, 241 (1969).