

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: ultrastructural<sup>1-3</sup>, métabolique<sup>4</sup> et génétique<sup>5</sup>. L'approche immunochimique n'a été que rarement utilisée, soit par la technique d'agglutination<sup>6</sup>, soit avec un critère majeur d'ordre phylétique<sup>7</sup>. Pourtant une telle méthode devrait pouvoir fournir, comme il a été démontré surtout en morphogénèse des Myxomycètes<sup>8</sup> et des animaux<sup>9</sup>, 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<sup>+</sup>) 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 (aschizogénie<sup>10</sup>). Ces souches ont été cultivées 96 h à 27°C en milieu liquide agité P de WESTERGAARD et MITCHELL<sup>11</sup> 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 optimum<sup>12</sup>, 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

<sup>1</sup> B. WEISS, J. gen. Microbiol. 39, 85 (1965).

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

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

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

<sup>5</sup> G. W. GRIGG, J. gen. Microbiol. 22, 662 (1960).

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

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

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

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

<sup>10</sup> G. TURIAN et N. OULEVEY, Experientia 24, 733 (1968).

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

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

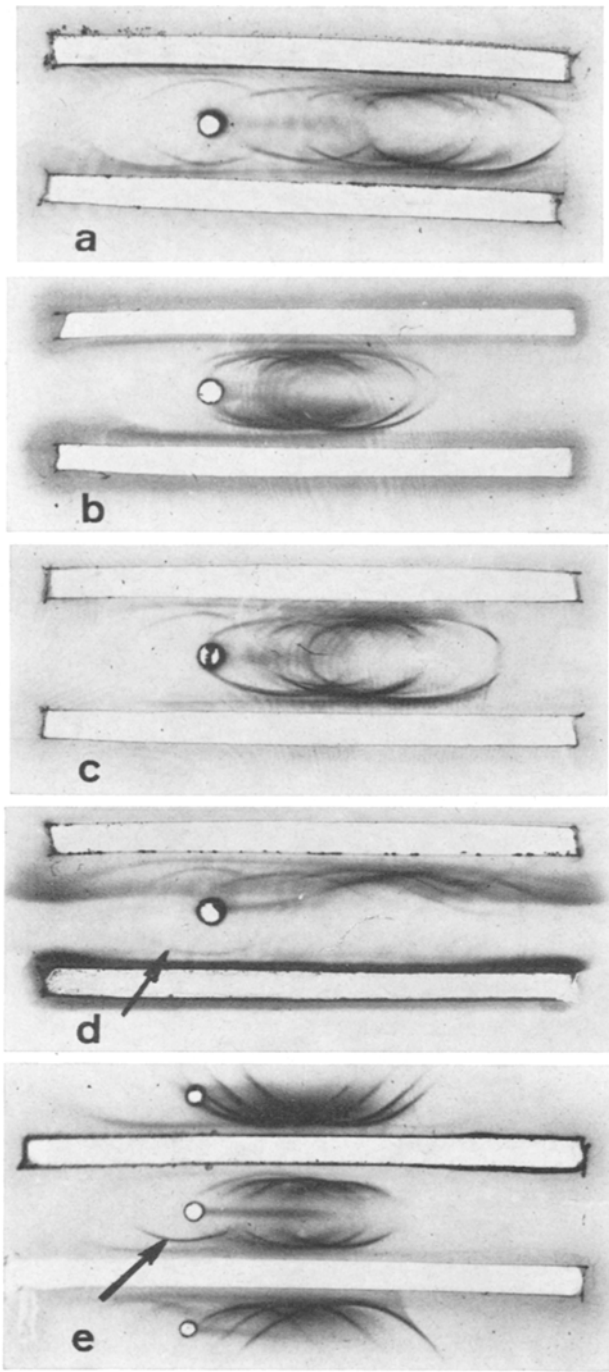


Fig. 1. Immunoélectrophorégrammes sur lames des extraits du type sauvage et du mutant «amyc» de *Neurospora crassa*. Les arcs de précipitation ont été colorés au rouge de thiazine R (Fluka).  
a) Extrait antigénique de Nc<sup>+</sup> révélé par son immunosérum homologue.  
b) Extrait antigénique d'«amyc» révélé par son immunosérum homologue.  
c) Extrait antigénique de Nc<sup>+</sup> révélé, en bas, par l'immunosérum hétérologue anti-«amyc»; en haut, par son immunosérum homologue brut.  
d) Extrait antigénique de Nc<sup>+</sup> révélé, en bas, avec l'immunosérum absorbé par l'antigène hétérologue «amyc» (flèche sur l'arc différentiel); en haut, par son immunosérum homologue brut.  
e) Extrait antigénique d'«amyc» induit à conidiation (puits central) révélé par l'immunosérum anti-«amyc» non induit (centre haut) et par l'immunosérum anti-Nc<sup>+</sup> (centre bas; flèche = arc différentiel récupéré). Dans les puits externes ont été déposés: en haut, l'antigène «amyc»; en bas, l'antigène Nc<sup>+</sup>.

une comparaison des protéines solubles du type sauvage et du mutant «amyc» séparées par électrophorèse en colonne de gel d'acrylamide. A cet effet, la méthode originale d'ORNSTEIN<sup>13</sup> et DAVIS<sup>14</sup> a été appliquée avec un appareil Buchler conçu pour l'électrophorèse en gel vertical, sur des colonnes de 4,5 mm de diamètre et 20 cm de longueur; la concentration en polyacrylamide du gel de séparation a été de 7,5%. Des aliquotes de 25 µl et de 50 µl d'extrait à analyser ont été mélangées avec du saccharose en solution finale de 5-10%<sup>15</sup>. La diffusion

code	Rp	NC +	amyc P <sub>s</sub>	amyc P <sub>su</sub>	
A	0050				
B	0095				
C	0105				
	0117				
	0130				
D	0147				R
E	0205				
	0220				
F	0238				
G	0280				R
	0303				
H	0325				
	0360				
I	0380				R
	0400				
J	0435				
K	0465				
L	0480				R
M	0500				
N	0515				R
O	0527				
P	0555				
	0590				
Q	0620				
R	0640				R
R <sub>1</sub>	0670				
S	0708				R
T	0735				
U	0760				R
V	0780				
W	0805				R
	0839				
X	0860				R
Y	0885				
Z	0945				
	1000				

Fig. 2. Diagramme électrophorétique comparatif des protéines établi sur la base de leur Rp (rapport proportionnel) défini comme position relative de chaque protéine par rapport à la distance maxima de 1000 parcourue par le marqueur au bleu de bromophénol. R = bandes récupérées par le mutant mis en condition conidiogène.

<sup>13</sup> L. ORNSTEIN, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964).  
<sup>14</sup> B. J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci. 127, 404 (1964).  
<sup>15</sup> P. J. SYRETT, J. exp. Bot. 17, 641 (1966).

des protéines a eu lieu à la tension de 180 volts pendant 4 h et leur distribution a été ensuite mise en évidence par la coloration à l'amidoschwarz selon DAVIS<sup>14</sup>.

Les diagrammes électrophorétiques des deux souches sur milieu Ps et de la souche mutante sur milieu inducteur, acétate-succinate, ont été comparés dans la Figure 2. L'amidoschwarz nous a permis de colorer et de distinguer, comme protéines solubles de la souche sauvage, 28 bandes (si l'on compte la bande R<sub>1</sub>, dédoublement diffus de R) toutes avec des degrés plus ou moins intenses mais suffisants de coloration. Avec le même critère d'appréciation, nous n'en avons compté que 23 pour la souche mutée. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues en 1962 par CHANG et al.<sup>16</sup> dans les premières séparations sur gel d'acrylamide de protéines solubles de *Neurospora*. Les aliquotes employées pour chaque analyse ont été ajustées au même titre d'azote protéinique (méthode de LOWRY et al.<sup>17</sup>); ainsi, les différences d'intensité de coloration des bandes, considérées comme le reflet de différences quantitatives entre souches, peuvent être estimées par densitométrie (recherches en cours). Quant aux différences qualitatives nettes, manifestées par les bandes en plus ou moins illustrées à la Figure 2, nous les avons mises à profit pour déterminer le degré de similarité entre souche sauvage et mutante à l'aide de la formule proposée par WHITNEY et al.<sup>18</sup> dans un but de taxonomie fongique. L'application de cette formule nous a permis de calculer que le 47% de bandes homologues entre souches sauvages et mutantes sur milieu Ps normal est passé à 85% quand le mutant a été induit à conidiation. Cette

augmentation rend compte de l'apparition de bandes communes correspondant très vraisemblablement à la récupération du pouvoir conidiogène par le mutant<sup>19</sup>.

**Summary.** The antigens and soluble proteins of *Neurospora crassa* wild-type and its conidiation deficient mutant 'amyc' were analyzed by immunoelectrophoresis and acrylamide gel electrophoresis respectively. Comparison of the patterns of the soluble proteins of the 2 strains, obtained with both techniques, showed an alteration of antigens and proteins in the mutant. A specific antigenic protein present in the wild-type, presumably in connection with conidiation, was also found in the mutant 'amyc' when it was induced to form conidia.

R. PEDUZZI et G. TURIAN

Laboratoire de Microbiologie,  
Institut de Botanique Générale de l'Université,  
1211 Genève 4 (Suisse), 24 juin 1969.

- <sup>16</sup> L. O. CHANG, A. M. SRB, F. C. STEWARD, *Nature* 193, 756 (1962).
- <sup>17</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- <sup>18</sup> P. J. WHITNEY, J. G. VAUGHAN et J. B. HEALE, *Expl. Bot.* 19, 415 (1968).
- <sup>19</sup> La préparation des anticorps a été réalisée à l'Institut d'Hygiène de Genève dans le laboratoire d'Immunochimie du Dr. C. AHMAD-ZADEH et nous le remercions de ses précieux conseils.

## Isolation of Blood Group A Substance from *Tubifex rivulorum*

It is a hitherto unexplained phenomenon that many invertebrates, mainly helminthes, contain glycoproteins which give remarkable cross-reactions with anti-blood group reagents, especially anti-A or anti-P. This subject has been reviewed by SOULSBY<sup>1</sup>, CUSHING<sup>2</sup> and PROKOP and UHLENBRUCK<sup>3</sup>. On the other side, they contain either in certain organs, like in the albumin gland of snails<sup>4</sup> or in their hemolymph<sup>5,6</sup> agglutinins, which do not resemble the immunoglobulins of other species<sup>5</sup>, but which exhibit a strong antibody-like specificity towards terminal sugar components, thus giving rise to many cross-reactions with red cells of different vertebrates, blood group substances and bacteria.

Recently, for instance, we could demonstrate<sup>7</sup> that the specificity of a certain agglutinin from the snail *Cepaea nemoralis* and of the agglutinin from the hemolymph of *Limulus polyphemus* is directed towards terminal N-acetyl-neuraminic acid, which inhibits the agglutination of red cells by these agglutinins. This agglutination is also abolished by neuraminidase. An interesting observation seems to be that exactly those invertebrate animals do not have any neuraminic acid in their body fluids and organs<sup>8</sup>.

It has been speculated that the agglutinins of the hemolymph<sup>9</sup> as well as those from snails and fish eggs<sup>4</sup> represent primitive defence or recognition factors. The latter have therefore been designated by us as protectins<sup>10</sup>. This view has been supported by BURNET<sup>11</sup> and throws new light on the evolution of the immune process,

especially in invertebrates, and on immunological conditions of their ecology.

In the course of further experiments in this field we found that from *Tubifex rivulorum* large amounts of blood group A substance can be obtained by extracting a saline homogenate (Waring blender) of these worms with 90% (v/v) phenol at room temperature. The dialysed and lyophilized water-layer yields larger amounts of a glycoprotein, which precipitates strongly with the anti-A from *Helix pomatia* and *Cepaea nemoralis* in agar gel diffusion, giving a line of identity with A substance prepared from peptone. In addition, the haemagglutina-

- <sup>1</sup> E. J. L. SOULSBY, *Adv. Immunol.* 2, 265 (1962).
- <sup>2</sup> J. E. CUSHING, *Fedn. Proc.* 26, 1666 (1967).
- <sup>3</sup> O. PROKOP and G. UHLENBRUCK, in *Human Blood and Serum-Groups* (McLaren, London 1969).
- <sup>4</sup> O. PROKOP, G. UHLENBRUCK and W. KÖHLER, *Vox Sang.* 4, 321 (1968).
- <sup>5</sup> J. J. MARCHALONIS and G. M. EDELMAN, *J. molec. Biol.* 32, 453 (1968).
- <sup>6</sup> E. COHEN, *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, II, 30, 427 (1968).
- <sup>7</sup> G. UHLENBRUCK and W. GIELEN, *Fortschr. Neurol.*, in press.
- <sup>8</sup> L. WARREN, *Comp. Biochem. Physiol.* 10, 153 (1963).
- <sup>9</sup> J. E. MCDADE and M. R. TRIPP, *J. Invertebrate Pathol.* 9, 523 (1967).
- <sup>10</sup> O. PROKOP, G. UHLENBRUCK and W. KÖHLER, *Dtsch. Gesundheitsw.* 23, 318 (1968).
- <sup>11</sup> F. M. BURNET, *Nature* 218, 426 (1968).