

other hand, the microsomal and soluble supernatant glutaminases possess the properties of 'kidney type' glutaminase⁸. The enzyme activity has also been found to be proportional to the rate of growth of tumour^{9, 10}.

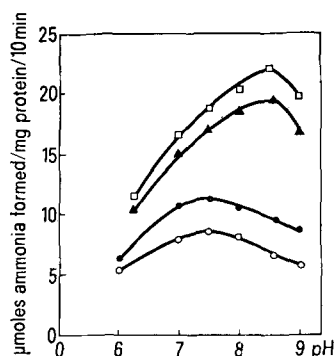


Fig. 4. PH optima curves of glutaminases of different fractions of mouse liver. ○—○ Normal liver mitochondria; ●—● EAC liver mitochondria; □—□ EAC liver microsome; △—△ EAC liver supernatant.

Summary. Glutamine aminohydrolase is found to be present in microsomal and soluble supernatant in liver of EAC-bearing mice. Enzymes obtained from these two sources were characterized and found to behave differently from the mitochondrial glutaminase of both normal and tumour-bearing mice.

SUKANYA CHAUDHURY, LEENA CHAUDHURY
and G. C. SHRIVASTAVA

*Indian Institute of Experimental Medicine, 4 Raja S.C.
Mullick Road, Calcutta 32 (India), 11 July 1975.*

⁶ B. M. BRAGANCA, J. H. QUASTEL and R. SCHUCHER, Arch. Biochem. Biophys. 52, 18 (1954).

⁷ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 263 (1951).

⁸ M. L. HOROWITZ, W. E. KNOX and H. P. MORRIS, Cancer Res. 29, 1195 (1969).

⁹ W. E. KNOX, G. C. TREMBLAY, B. B. SPANIER, G. H. FRIEDEL, Cancer Res. 27, 1456 (1967).

¹⁰ W. E. KNOX, M. L. HOROWITZ and G. H. FRIEDEL, Cancer Res. 29, 669 (1969).

Analyse expérimentale de l'expression de la mutation létale récessive («ulcère») chez l'embryon de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien Urodèle)

Experimental Studies of the Expression of a Lethal Recessive Mutation ('ulcère') in *Pleurodeles waltlii* embryo (Amphibia Urodela)

La mutation «ulcère» (*u*), mutation létale récessive du Pleurodèle identifiée par SIGNORET et al.¹ se manifeste au moment de l'éclosion et avant la première prise de nourriture. Elle est caractérisée par une croissance générale diminuée et un arrêt du développement du bourgeon du membre antérieur, par des branchies faiblement ramifiées et un ulcère ventral correspondant à une éversion de l'intestin et de la paroi abdominale. Au niveau histologique elle est caractérisée par la persistance dans tous les types cellulaires de plaquettes vitellines et celles-ci sont particulièrement abondantes au niveau du tube digestif dont l'histodifférenciation est retardée. Le cytoplasme apparaît vacuolisé dans le foie et le pronéphros et les fibrilles musculaires sont dissociées.

Dans le but de rechercher si la mutation «ulcère» s'exprime de façon autonome ou non nous avons effectué des expériences du type de celles mises en oeuvre chez l'*Axolotl* par HUMPHREY^{2, 3} au cours de l'étude de plusieurs mutations et chez le Pleurodèle par GOUNON et

COLLENOT⁴ au cours de l'analyse de l'expression de la mutation «létal-mitotique».

Méthode expérimentale. Nous avons réalisé plusieurs types d'opérations sur des embryons au stade du bourgeon caudal (stades 22 à 24 de la table chronologique⁵): 1. des associations en parabiose ou en télوبiose, 2. des associations en chimères hémiparties selon la technique de HOUILLON⁶, 3. des greffes hétérotopiques d'ébauches d'organes, 4. des greffes hétérotopiques de parties antérieures et postérieures d'embryons, la section transversale étant effectuée au niveau du champ du membre antérieur.

Ces opérations ont été réalisées dans la solution physiologique de STEINBERG⁷. Les séries d'associations en parabiose, télوبiose et chimères hémiparties étaient mises en oeuvre avec des embryons appartenant à une même ponte issue de parents hétérozygotes de telle sorte que sur l'ensemble des opérations réalisées 6/16 (37,5 %) d'entre elles représentent des combinaisons entre un embryon normal et un embryon létal. Les greffes hétérotopiques d'ébauches d'organes et de parties antérieures et postérieures d'embryons ont été effectuées sur le flanc, les embryons donneurs provenaient de pontes issues de parents hétérozygotes et les embryons receveurs appartenaient à des pontes standard; ainsi

Opérations	Nombre d'opérations réalisées	Nombre de combinaisons létal-normal obtenues et pourcentage correspondant
Associations en parabiose	92	30 (32,6%)
Associations en télوبiose	86	31 (37,2%)
Chimères hémiparties	95	29 (30,5%)
Greffes tête et abdomen	71	22 (31%)
Greffes d'ébauches		
Œil	19	5 (26,3%)
Membre antérieur	27	6 (22,2%)
Queue	32	9 (28,1%)

¹ J. SIGNORET, A. COLLENOT et L. GALLIEN, C. r. Acad. Sci., Paris 262, 699 (1966).

² R. R. HUMPHREY, Devl Biol. 4, 423 (1962).

³ R. R. HUMPHREY, J. exp. Zool. 155, 139 (1964).

⁴ P. GOUNON et A. COLLENOT, Experientia 30, 1079 (1974).

⁵ L. GALLIEN et M. DUROCHER, Bull. biol. Fr. Belg. 97, 94 (1957).

⁶ CH. HOUILLON, C. r. Acad. Sci., Paris 258, 3901 (1964).

⁷ M. STEINBERG, Carnegie Inst. Washington Year Book 56, 347 (1957), cité par J. D. EBERT.

1 opération sur 4 devait réaliser une combinaison «léthal-normal». Les embryons donneurs ont été élevés jusqu'au moment de la prise de nourriture de manière à reconnaître ceux qui étaient léthaux. C'est à partir de ce stade que l'évolution des combinaisons «léthal-normal» a été régulièrement observée et comparée à celle de combinaisons «normal-normal». Les données numériques concernant l'ensemble des opérations réalisées sont rassemblées dans le Tableau. Les fixations ont été effectuées à l'aide du liquide fixateur de Bouin-Hollande et l'étude histologique a été réalisée après inclusion dans la paraffine et coloration des coupes par le rouge nucléaire solide et le picro-indigocarmin.

Résultats. Parabioses et télobioses. L'association en parabiose ou en télobiose ne modifie pas les caractères morphologiques externes ni le moment de l'expression de la mutation «ulcère». Associés ou non en parabiose et télobiose, les individus *u/u* ont le même aspect au stade de la prise de nourriture (stades 37–38; Figures 1 et 2). L'évolution des embryons léthaux n'est pas modifiée et l'on

assiste, dans les jours qui suivent l'apparition du syndrome caractéristique de la mutation, à la cytolysse et à la désagrégation de la totalité de l'embryon léthal. En outre, l'embryon normal auquel il est associé meurt inéluctablement dans un délai de 15 jours après avoir manifesté progressivement de l'anémie; celle-ci est appréciée par la quantité d'hématies qui transitent au niveau du coeur et des filaments branchiaux. L'anémie est concomitante de l'apparition de stases sanguines sur les flancs et au niveau du pronéphros des individus normaux et léthaux. L'ablation, facilement réalisable dans le cas des télobioses, de l'embryon léthal en cours de cytolysse nous a permis de constater qu'elle empêchait la mort de l'embryon normal de l'association, les signes d'anémie qu'il manifestait s'estompent progressivement et il peut atteindre l'état adulte. Cependant il convient de noter que la guérison est d'autant plus fréquente et rapide que la séparation a été réalisée plus tôt après l'expression de la mutation.

L'étude histologique des associations en parabiose au

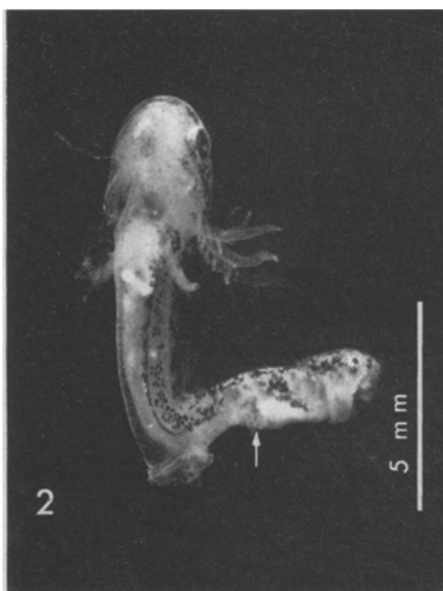


Fig. 1. Association en télobiose «normal-léthal» au stade 39, 8 jours environ après l'expression de la mutation; le membre de l'individu léthal ne s'est pas développé (flèche).

Fig. 2. Association en télobiose «normal-léthal» au stade 40, 10 jours environ après l'expression de la mutation; l'individu léthal présente un ulcère ventral (flèche), la bouche est béante, les branchies sont peu développées.

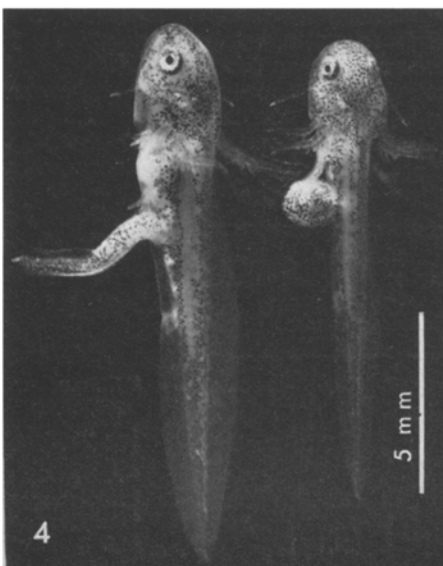
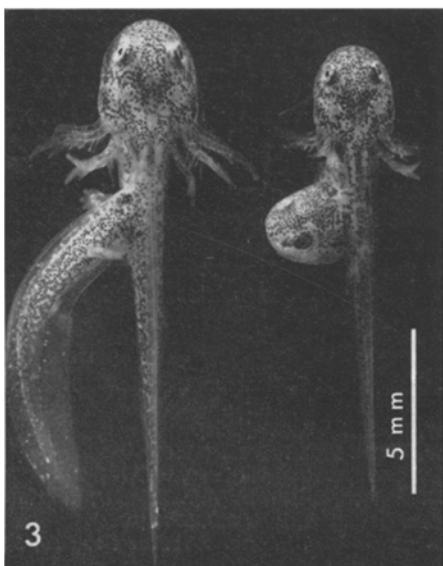


Fig. 3. Greffes hétérotopiques de parties antérieure et postérieure d'embryon normal.

Fig. 4. Greffes hétérotopiques de parties antérieure et postérieure d'embryon léthal. Ces greffes sont en cours de dégénérescence. Les porte-greffes sont au stade 41 soit 11 jours environ après l'expression de la mutation.

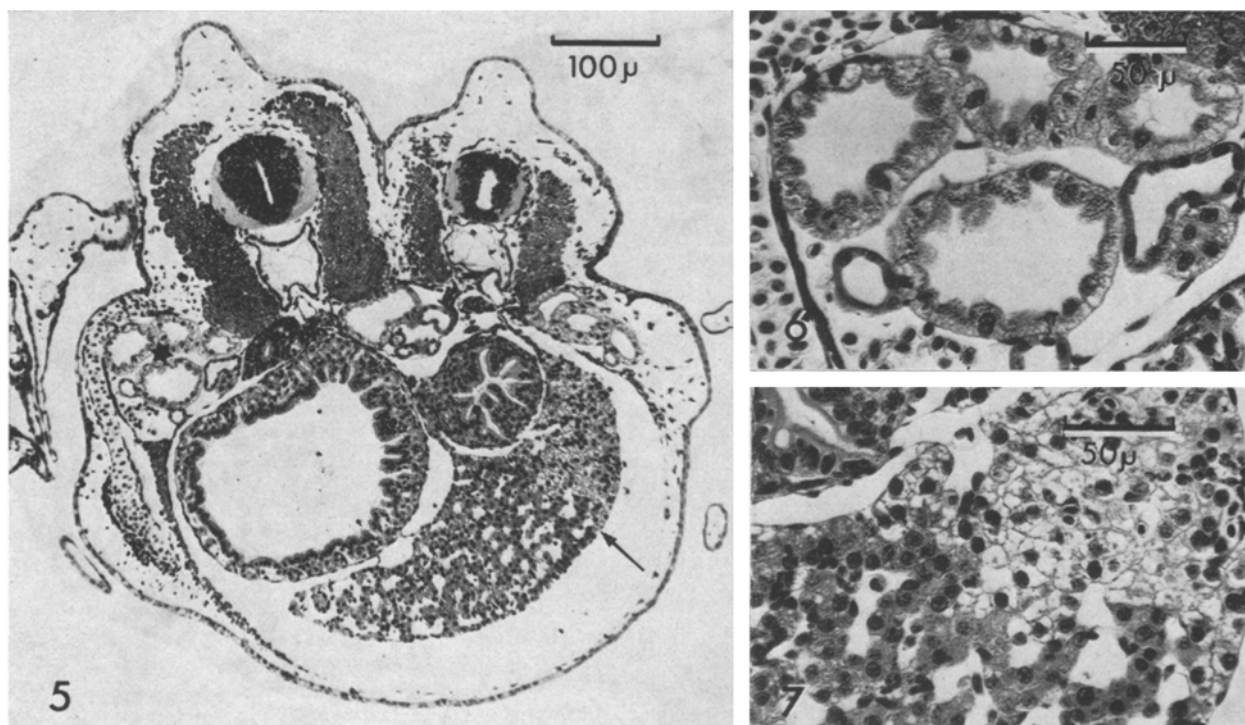


Fig. 5. Coupe histologique d'une association en parabiose «normal-léthal» au stade 39 (l'individu léthal est à droite). Le foie, unique, est un organe chimère, la limite des parties normale et léthale est indiquée par la flèche. La structure du pronephros de l'individu normal est altérée (étoile).

Fig. 6. Partie agrandie de la Figure 5 montrant la structure altérée du pronephros de l'individu normal.

Fig. 7. Partie agrandie de la Figure 5, le cytoplasme des cellules hépatiques de l'individu léthal est clair en raison de l'élimination de nombreuses enclaves lipidiques au cours de la préparation histologique.

moment où s'exprime la mutation permet d'observer la juxtaposition des embryons normaux et léthaux. Chez ces derniers, les plaquettes vitellines sont résorbées mais le foie, le pronephros et les cellules musculaires ont le même aspect que chez les individus léthaux libres. En outre la structure du pronephros de l'individu normal associé est altérée (Figure 5).

Chimères. Lorsque les tissus léthaux sont antérieurs, les conditions et les caractères de l'expression de la mutation ne sont pas modifiés par l'intervention expérimentale et la mort de la chimère est inéluctable en raison des anomalies céphaliques caractéristiques de la mutation; cette mort survient dans les mêmes délais que chez les individus léthaux libres. Lorsque les tissus léthaux sont postérieurs, ils se cytolysent plus tardivement et la partie antérieure présente de l'anémie; la mort de la chimère survient 30 jours environ après l'expression de la mutation. Pendant cette durée la chimère se nourrit et le tube digestif assure le transit. Dans une telle association, les tissus endodermiques léthaux et notamment l'intestin atteignent un degré d'organisation et de différenciation plus élevé que celui observé chez les individus léthaux libres ou associés en parabiose et télobiose. L'étude histologique et ultrastructurale de telles chimères sera exposée ultérieurement.

Greffes hétérotopiques. a) La greffe hétérotopique d'ébauches d'oeil, de membre antérieur et de queue sur un embryon normal ne modifie pas le degré d'organisation atteint par les ébauches qui, 2 semaines après l'expression de la mutation chez les embryons donneurs correspondants, ont involué; elles ne sont plus décelables qu'au niveau histologique sous la forme de quelques cellules à

noyau pycnotique et d'amas de mélanine. b) Les parties antérieures et postérieures d'embryons léthaux greffées sur le flanc d'embryons normaux expriment la mutation. L'évolution ultérieure de ces combinaisons est comparable à celle des associations en parabiose et télobiose: les parties greffées se cytolysent dans les 20 jours qui suivent l'expression de la mutation (Figures 3 et 4); les embryons porteurs meurent après avoir présenté de l'anémie.

Discussion et conclusions. L'ensemble des résultats démontre que l'expression de la mutation «ulcère» est autonome et que la léthalité est inéluctable quelles que soient la quantité et la nature des tissus greffés. Néanmoins l'évolution du tube digestif, par exemple, peut se poursuivre temporairement à la faveur d'une association en chimère hémipartie. Les embryons *u* n'ont pas été guéris de leurs anomalies contrairement à ce que HUMPHREY² a observé pour la mutation *v* de l'*Axolotl*. Le caractère autonome de l'expression de la mutation *u* est à rapprocher de celui des mutations *lm* du *Pleurodèle* (GOUNON et COLLENOT⁴) et *l* de l'*Axolotl* (CHUNG et BRIGGS⁸). En outre, il faut souligner le fait que dans la plupart des combinaisons, les individus normaux sont morts après avoir présenté de l'anémie dont les tissus léthaux associés sont sans doute à l'origine puisque la dissociation de télobioses permet la guérison des individus anémiés. Des faits comparables ont été observés par JAYLET et al.⁹ à propos de la

⁸ H. M. CHUNG et R. BRIGGS, *J. exp. Zool.* 191, 33 (1975).

⁹ A. JAYLET, J. C. BEETSCHEN et P. DEPARIS, *C. r. Acad. Sci., Paris* 271, 233 (1970).

mutation *ac* du Pleurodèle. L'étude histologique et ultrastructurale déjà entreprise des embryons mutants, libres ou associés, permettra de préciser les caractères de l'expression de la mutation *u* au niveau cellulaire.

Summary. The autonomous expression of a recessive lethal mutation ('ulcère' *u*), isolated in the salamander *Pleurodeles waltlii* Michah. is demonstrated by the way of parabiotic and telobiotic associations, allogenic chimaeras,

heterotopic grafts of organ primordia and of anterior or posterior parts from lethal embryos.

P. GOUNON et A. COLLENOT

Laboratoire de Biologie animale 7 PCEM, Bât. C 602, Université Pierre et Marie Curie 4, Place Jussieu, F-75230 Paris Cedex 05 (France), et Centre de Recherches d'Ivry du CNRS (France), le 28 Avril 1975.

Ultrastructure of Cell-Mediated Immunity. I. Comparison between E and EA Rosettes

In previous studies, the ultrastructural appearance of interaction between human lymphocytes and chicken red cells in the course of phytohemagglutinin-induced¹ and antibody-mediated² cytotoxicity were described. In both types of cytotoxicity, interdigitations between some lymphocytes and target cells were observed.

The present study deals with the ultrastructure of the interaction of human lymphocytes and erythrocytes in E rosettes, considered to be specific for T lymphocytes³

and EA rosettes, in which the rosetting lymphocyte is supposed to be a B lymphocyte with receptors for the Fc fragment of IgG⁴.

Materials and methods. The technique for separation of lymphocytes, obtained from 8 healthy volunteers, has already been described¹. Preparation of E rosettes was performed according to JONDALL et al.⁵. Sheep red cells stored in Alsever at 4°C were washed 3 times in Hanks and resuspended in the same medium to a final concentration of 0.5%; 0.25 ml of lymphocytes suspension (4×10^6 cells/ml) were mixed with 0.25 ml of sheep red cells suspension, incubated for 5 min at 37°C, centrifuged at 800 rpm for 5 min and then incubated again for 12 h at 4°C. At the end of the incubation, the cell mixture was gently resuspended and a drop was put on a microscope slide and observed in the light microscope. The percentage of lymphocytes binding more than 3 sheep erythrocytes over a total of 300 lymphocytes was recorded.

Preparation of EA rosettes was performed according to HAEGERT et al.⁴. Ox red cells were washed 3 times in *Tris*-Hanks and resuspended at a final concentration of 2%. The suspension was sensitized with rabbit IgG anti-ox antiserum at a subagglutinating dose, for 1 h at room temperature. The sensitized cells were then washed 3 times in *Tris*-Hanks and a 0.8% suspension was prepared. For testing, 1 drop of sensitized ox red cells and 1 drop of lymphocytes suspension (2×10^6 cells/ml) were mixed in a test tube and centrifuged at 300 g at 4°C. Counting of rosettes was performed as described above.

For each experiment, samples of cells mixtures of E and EA rosettes were processed for electron microscopy.

Results. The percentage of E rosettes varied in the 8 subjects studied from 58 to 72, that of EA rosettes from 22 to 26. The ultrastructural observation of E and EA rosettes showed differences in the 2 types of rosetting lymphocytes. Those of E rosettes were grossly round in shape (Figure 1), whereas those of EA rosettes were almost invariably in the shape of uropods⁶ (Figure 2).

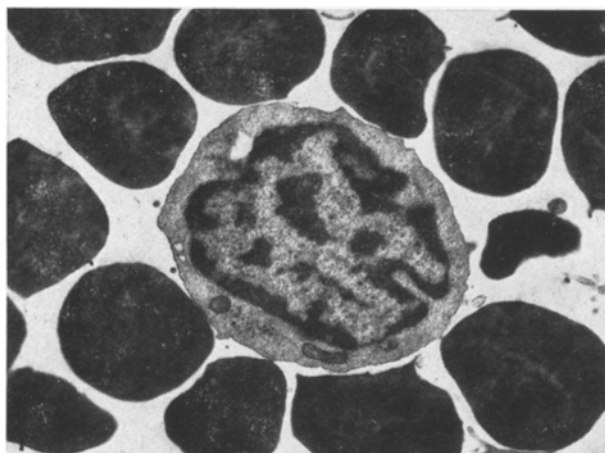


Fig. 1. E Rosette. Sheep red cells are regularly arranged around a lymphocyte, grossly round in shape. Limited areas of membrane contact between lymphocyte and erythrocytes are visible. $\times 8,500$.

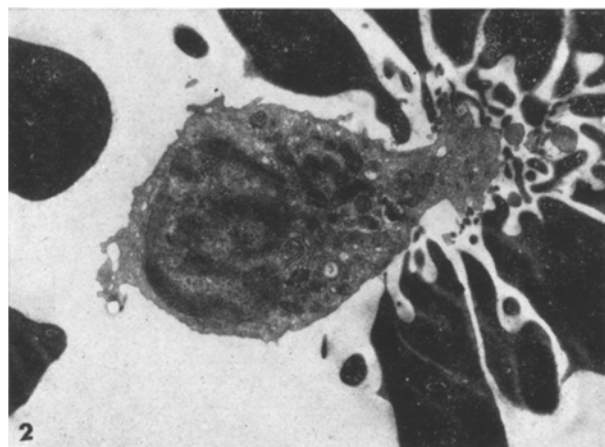


Fig. 2. EA rosette. Sensitized ox red cells are visible surrounding one pole of a lymphocyte elongated in shape. Numerous cytoplasmic pseudopods protrude from the red cells and come into contact with the lymphocyte membrane. $\times 8,500$.

¹ G. TONIETTI, G. PECCI, C. LIBERATORE, F. SALSANO and L. FONTANA, *Br. J. Haemat.* **30**, 71 (1975).

² L. FONTANA, G. DE SANCTIS, G. PECCI and G. TONIETTI, submitted for publication.

³ S. S. FRÖLAND and J. NATVIG, *Transplant. Rev.* **16**, 114 (1973).

⁴ D. G. HAEGERT, T. ALLBERGH and R. R. A. COOMBS, *Int. Arch. Allergy* **46**, 525 (1974).

⁵ M. JONDALL, G. HOLM and H. WIGZELL, *J. exp. Med.* **136**, 207 (1972).

⁶ P. BIBERFELD, *Expl Cell Res.* **66**, 433 (1971).