

It also has been noted that a more constant and greater inhibition of the hemolytic Streptococcus is obtained with a finer dispersion of liver tissues, such as that produced by mechanical grinding.

M. N. LEWIS and B. S. SCHWARTZ

Department of Pharmacology and Chemotherapy,
Warner Institute for Therapeutic Research, New York,
August 12, 1949.

Riassunto

Le sospensioni di fegato di ratto esplicano attività antibatterica *in vitro* verso lo Streptococco β -emolitico. Tale azione è di una certa specificità in quanto sospensioni preparate allo stesso modo di rene, polmone, milza, cuore, cervello e muscoli sono inattive di fronte a questo microorganismo. Inoltre le medesime sospensioni, compresa quella di fegato di ratto, sono inattive se cimentate con *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

Données histochimiques sur les phosphatases alcalines chez *Acanthochites fascicularis* L.

L'importance des phosphatases dans le métabolisme des Mollusques est connue (voir en particulier MANIGAULT¹, mais nous n'avons pas trouvé, dans les périodiques qui nous ont été accessibles, de recherches histochimiques, permettant une localisation à l'échelle cellulaire. Aussi nous a-t-il paru intéressant de compléter nos études histologiques sur les Polyplacophores (GABE et PRENANT²), par la mise en évidence histochimique des phosphatases alcalines chez *Acanthochites fascicularis* L.

L'étude a porté sur des exemplaires aimablement récoltés à notre intention par le Prof. E. FISCHER et par M. A. FRANC (Laboratoire maritime de Dinard). Les pièces ont été fixées à l'alcool et à l'acétone, incluses à la paraffine et débitées en coupes séries. L'enzyme a été mis en évidence suivant GOMORI³; en cas de besoin, les pièces ont été décalcifiées par le citrate d'ammonium à 5%. L'abondance toute particulière du fer figuré chez les Chitons oblige à éliminer cette cause d'erreur par la pratique successive de la réaction de GOMORI et de celle du bleu de Turnbull sur la même préparation (ARVY et GABE⁴).

Comme nous l'avons montré dans nos travaux précédents, les fixateurs à base d'alcool ou d'acétone conservent très mal les structures cellulaires chez les Polyplacophores. C'est dire que la localisation intracellulaire de la diastase est souvent malaisée.

Le tégument est très pauvre en phosphatase; seules certaines des granulations des cryptes glandulaires épidermiques donnent la réaction de Gomori. Les esthètes n'en contiennent pas, de même que l'épithélium de la face ventrale du pied; celui des versants latéraux du pied est doué d'une activité phosphatasique discrète. Les branchies sont dépourvues de phosphatase.

Parmi les épithéliums de la poche buccale, seul celui du versant dorsal donne la réaction, quand on a soin d'éliminer l'erreur due au fer. L'épithélium de la gaine radulaire est dépourvu de phosphatase et sa coloration en noir est due à la présence de calcium et de fer figuré.

Par contre, la glande à sucre est très riche en phosphatase alcaline; les cellules pariétales donnent la réaction dans les régions supra-nucléaires alors que les cellules des villosités noircissent en totalité (fig. 1). Ces localisations diffèrent entièrement des granulations noires après



Fig. 1. - Glande à sucre (à droite) et bande ciliée de l'estomac (à gauche). Fixation à l'alcool, réaction de Gomori. Remarquer l'intensité de la réaction dans les villosités de la glande à sucre. Photomicrographie, 400 diamètres.

action du sulfure d'ammonium, signalées dans un travail précédent. Dans l'œsophage postérieur, la réaction est localisée dans une bande étroite au pôle apical des cellules.

Les bandes ciliées de l'épithélium gastrique sont dépourvues de phosphatase; les régions non ciliées donnent fortement la réaction; comme dans le cas de l'œsophage, l'activité phosphatasique est localisée au pôle apical de la cellule. Dans l'intestin antérieur, qui, du point de vue cytologique, se rapproche des régions non ciliées de l'estomac, la réaction est également intense. Le foie est dépourvu de phosphatase histochimiquement décelable (fig. 2).

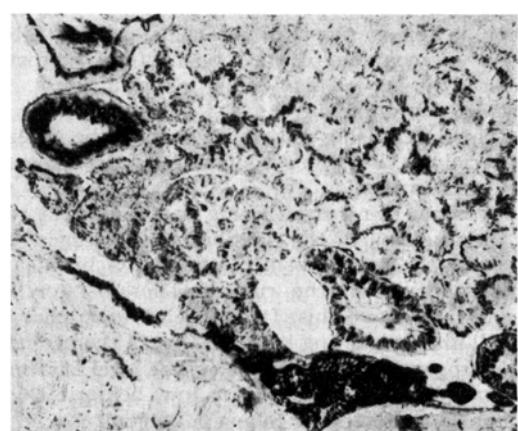


Fig. 2. - Pied et masse viscérale d'*Acanthochites fascicularis*. Fixation à l'acétone, réaction de Gomori. Le tissu conjonctif et musculaire du pied est à peu près dépourvu d'activité phosphatasique (les grains noirs sont dus à la présence de fer figuré). Réaction intense du rein (entre le pied et la masse viscérale), des régions proximales de l'intestin postérieur (angle supérieur gauche). Réaction moins intense des régions distales de l'intestin postérieur, compte tenu de la présence de fer figuré. La teinte noire des cellules basales des tubuli hépatiques est due à la présence de calcium. Photomicrographie, 30 diamètres.

¹ P. MANIGAULT, Ann. Inst. océanographique 18, 331 (1939).

² M. GABE et M. PRENANT, Arch. Anat. micr. 37, 136 (1948); Acta morph. Neerl. 6, 404 (1949); Arch. Biol. 60, 39 (1949); Arch. Anat. micr. 37, 65 (1949); Ann. Sci. nat. zool., sous presse (1949); C. R. Ass. Anat., sous presse (1949); La Cellule, 53, 99 (1949).

³ G. GOMORI, Amer. J. Clin. Pathol. 16, 347 (1946).

⁴ L. ARVY et M. GABE, Bull. Histol. appl., sous presse (1949).

L'intestin postérieur contient une phosphatase alcaline; la réaction, dont l'intensité diminue à mesure que l'on se rapproche du rectum, est donnée à la fois par le pôle apical de la cellule et par la limite basale (fig. 3). Les trois catégories cellulaires (cellules ciliées, muqueuses et glandulaires) se comportent de façon identique. Dans la dernière anse de l'intestin postérieur, très riche en fer figuré, la phosphatase est localisée à une bordure apicale très mince (fig. 4). Le rectum est dépourvu de phosphatase.

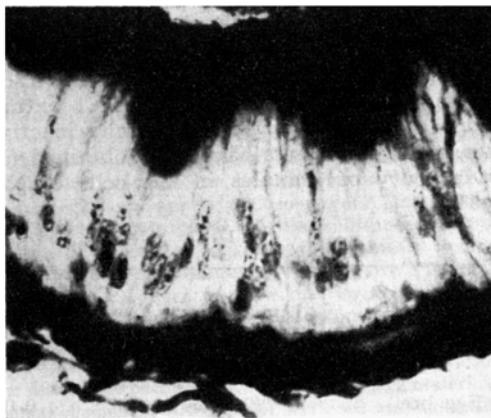


Fig. 3. – Détail de la fig. 2. Région proximale de l'intestin postérieur. Remarquer l'intensité de la réaction au pôle apical et à la base des cellules. Photomicrographie, 400 diamètres.

Toutes les parties du rein et du canal réno-péricardique sont très riches en phosphatase alcaline. Toutes les cellules sont uniformément colorées en noir; les fixations obligatoires dans la recherche histochimique des phosphatases créent des artefacts particulièrement grossiers et il ne nous a pas été possible de mettre en évidence des localisations intracellulaires préférentielles.

Les spermatogones et les spermatocytes sont dotés d'une phosphatase alcaline, à la fois nucléaire et cytoplasmique. Les spermatides et les spermatozoïdes en sont dépourvus.

Dans les ovocytes, la réaction de la phosphatase alcaline est strictement localisée aux nucléoles. La comparaison des différents stades évolutifs permet de retrouver

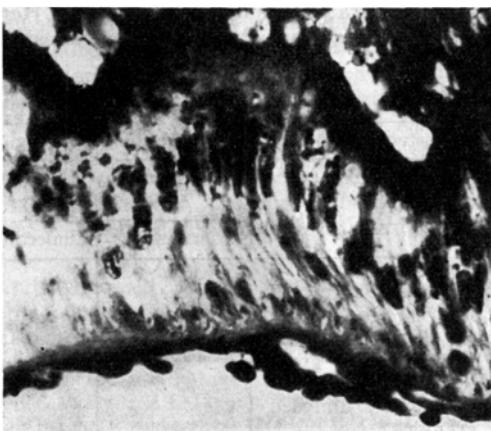


Fig. 4. – Même pièce que fig. 2. Réaction de Gomori suivie de réaction du bleu de Turnbull. Dernière anse de l'intestin postérieur. Remarquer l'étendue moindre des bandes noires aux pôles des cellules (comparer avec la fig. 3). Les chapelets de grains de la région supra-nucléaire des cellules représentent du fer figuré; ils sont colorés en bleu sur la préparation. Photomicrographie, 400 diamètres.

l'ensemble des structures nucléolaires décrites dans un travail précédent. L'épithélium ovarien, dont nous avons décrit ailleurs les particularités cytologiques, donne intensément la réaction (fig. 5).

Les cellules conjonctives et musculaires ne contiennent pas de glycérophosphatase; les cellules sanguines en sont également dépourvues (ARVY et GABE¹). Les cellules nerveuses sont douées d'une activité phosphatasique très discrète.

Le résultat négatif de la recherche histochimique au niveau de certains tissus ne signifie évidemment pas l'absence d'activité phosphatasique. LISON² insiste, à juste titre, sur le fait que l'ensemble des lyoenzymes échappe à la détection histochimique. C'est avec cette restriction que l'on peut souligner de tels résultats dans les épithéliums qui élaborent des formations calcifiées et dans les cellules hépatiques.

Parmi les localisations au niveau du tube digestif, la présence d'une activité phosphatasique intense au niveau de la glande à sucre vient compléter nos connaissances biochimiques sur cet organe, qu'il y a lieu de considérer comme la vraie glande salivaire des Polyplacophores. Les régions du tube intestinal les plus riches en phosphatase alcaline sont celles que nous avons été amenés à considérer comme intervenant dans l'absorption.

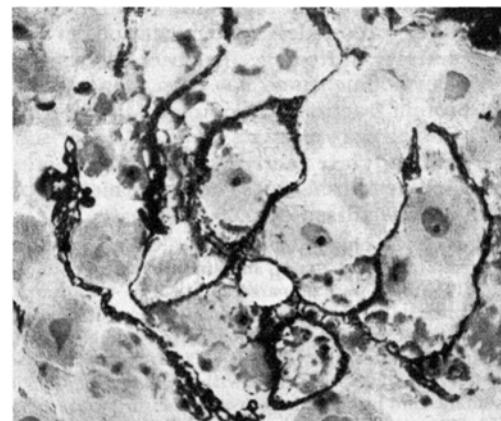


Fig. 5. – Ovaire d'*Acanthochites fascicularis*. Acétone, réaction de Gomori. Noircissement des nucléoles des ovocytes et de l'épithélium ovarien. Photomicrographie, 120 diamètres.

Les éléments de la lignée séminale se comportent au point de vue de l'activité phosphatasique comme chez d'autres animaux.

L'activité phosphatasique intense des épithéliums rénal et ovarien est à rapprocher de leur origine cœlomique commune.

Conclusion. L'organisme d'*Acanthochites fascicularis* est riche en phosphatase alcaline histochimiquement décelable. Parmi les localisations, il faut signaler notamment les cellules de la glande à sucre, l'épithélium intestinal absorbant, les éléments de la lignée séminale et les nucléoles des ovocytes, enfin les dérivés de l'épithélium cœlomique que sont l'épithélium rénal et ovarien.

M. GABE et M. PRENANT

Laboratoire d'anatomie et d'histologie comparées de la Sorbonne, Paris, le 12 août 1949.

¹ L. ARVY et M. GABE, Bull. Soc. Zool. France, sous presse (1949).

² L. LISON, Bull. Histol. appl. 25, 23 (1948).

Zusammenfassung

Der histochemische Nachweis der alkalischen Phosphatase bei *Acanthochites fascicularis* L. (Polyplacophora, Mollusca) erbringt den Beweis eines ausgedehnten Vorhandenseins des Ferments. Das Integument, das Bindegewebe und das Muskelgewebe enthalten keine oder nur Spuren von Desmophosphatase. Der Verdauungsapparat, insbesondere die Zuckerdriise und der Mitteldarm sind dagegen reich an Phosphatase, desgleichen die Niere, die Spermatogonien und Spermatozyten, die Nukleolen der Oozyten und das Epithel des Ovariums.

Apyrase Distribution in Sea-Urchin Eggs

One of the earliest steps following the fertilization of a sea-urchin egg is a very considerable amount of molecular rearrangement¹ which is necessary for the initiation of development. There is no satisfactory explanation of where the extra energy for initiating these reactions comes from since O_2 consumption in some species is increased² while in others it is decreased³. By analogy with muscle it might seem reasonable that rapid demands for energy could be met by phosphate bond energy. If this be so, the unfertilized egg would either have to have ATP-ase systems already present, or, the activation of such enzyme systems would have to be one of the early steps following fertilization.

Apyrase activity in frog eggs has been identified after 50 hours of development and has been found to exist in at least 3 protein fractions or complexes⁴. In *Strongylocentrotus*, whole egg extracts, and Weber solution extracts yield apyrase activity and there is some evidence that fertilized eggs contain more apyrase activity than unfertilized eggs⁵.

Chemical. ATP was obtained as the Ba salt. This was dissolved, the metal precipitated and the pH adjusted to 7. Stock solutions of 10 mg free ATP per ml were prepared and kept at $-20^\circ C$ until used. Calcium activator 0.01 mg/ml final concentration was used in most cases and buffer for protein extraction was 0.1 M glycine-NaOH, pH 9. Proteins were precipitated with 80% trichloroacetic acid and phosphate determinations were made with ammonium molybdate- β -naphtholsulfonic acid using a photoelectric colorimeter.

Eggs. Living material was obtained fresh daily and eggs were collected, strained through gauze and washed several times with filtered sea-water. In some cases eggs were subjected to lyophilic processes from a preliminary freezing at $-20^\circ C$. Fertilized eggs were obtained by treating eggs with sperm for such a time as to give 90% membrane elevation (c. 10 min. at $25^\circ C$) and were then lyophilized as above. All extracts derived from eggs were handled at $1^\circ C$ throughout chemical treatment.

Apyrase Activity. In the case of whole eggs tested for surface apyrase activity, 100 mg wet weight of eggs was added per ml of ATP (1 mg/ml) solution in sea-water, and held at pH 9 with glycine buffer. For whole egg homogenates and for lyophilized fractions, 50 mg dry weight of substance was used per 10 mg of ATP solution (pH 7, with $CaCl_2$ activator). Incubation was for 1 or 2 hours at $25^\circ C$ and 1 ml of 80% CCl_4COOH was added and the tubes iced at the end of the run.

Results. The data fall under the following general classifications: (1) examination of the apyrase activity of the surface of living eggs; (2) the apyrase activity of a brei of fresh eggs; and (3) activity in lyophilized, dialysed and protein-fractionated eggs.

¹ Cf. J. RUNNSTRÖM, L. MONN, and E. WICKLUND, Nature 153, 313 (1944).

² D. M. WHITAKER, J. Gen. Physiol. 15, 183 (1931).

³ D. M. WHITAKER, J. Gen. Physiol. 16, 475 (1933).

⁴ L. G. BARTH and L. JAEGER, J. Cell. Comp. Physiol. 30, 111 (1947).

⁵ W. M. CONNORS and B. T. SCHEER, J. Cell. Comp. Physiol. 30, 271 (1947).

Living *Arbacia* eggs, both fertilized and unfertilized and with jelly coats removed, were analysed for surface apyrase activity in sea-water at pH 7 and 9. There was no appreciable hydrolysis of ATP after 2 hours at $25^\circ C$. Recent results¹ with yeast have shown that this cell has several types of phosphatases at the cell surface including apyrase. These enzymes, however, have an optimal activity at pH 3.5 and almost no activity at pH 7.

Eggs disrupted by grinding with sand, as well as eggs fractionated by chemical means were assayed for apyrase activity with the results (for *Arbacia*) as indicated in Figure 1. It is to be noted that the egg granule fraction gave activity results practically equal to those obtained with unfractionated egg brei. The other various fractions, with the possible exception of the KCl extract of fertilized eggs (dialysed), were practically inactive. In this respect similar results have been obtained for the apyrase activity of granules in the cells of chicken embryos².

Fig. 1

Living eggs	
fertilized	unfertilized
(1.0)	(1.0)
Egg brei	(20.0)
Lyophilic & dialysed	(9.1)
Et ₂ O extract	
Water extract	(5.5)
KCl M extract	(3.5)
Dialysed	(8.0)
Urea 20% extract	(0.0)
Dialysed	(3.2)
Residual granules	(17.0)
Dialysed	(19.8)
	(10.6)
	(10.6)

Arbacia egg fractionation scheme. Figures in parentheses represent per cent hydrolysis of ATP per hour for 50 mg dry weight of egg material.

Further experiments on another form (*Paracentrotus*) were carried out to test the general validity of the idea that the protoplasmic granules were the site of apyrase activity. These data are included in Table 1. Here the lyophilized but unfractionated eggs showed considerably

Table I

Apyrase activity of fractions of <i>Paracentrotus</i> eggs		
Fraction	Per cent hydrolysis of ATP/hr/50 mg eggs	
	fertilized	unfertilized
Lyophilized, ether extracted and dialysed eggs . . .	5.0	5.1
Lyophilized, ether extracted and dialysed egg granules	25.8	13.7
Lyophilized and dialysed egg granules	18.0	13.8

¹ A. ROTHSTEIN and R. MEIER, J. Cell. Comp. Physiol. 32, 77 (1948).

² H. B. STEINBACH and F. MOOG, J. Cell. Comp. Physiol. 26, 175 (1945).