

libres et certains polypeptides courts. D'autres substances (polypeptides longs, glucides, etc.) traversent la colonne et constituent le filtrat, qui, après hydrolyse, fournit les acides aminés de corps solubles contenant des liaisons peptidiques. L'élution des acides aminés libres retenus par la résine est faite par NH_4OH N. Les hydrolyses sont faites par HCl 6 N à 100° pendant 24 h. Des distillations répétées sous vide permettent d'éliminer la plus grande partie de HCl . La purification s'effectue ensuite par passage sur permutite C_{50} et élution comme précédemment. La séparation est faite par chromatographie sur papier à 2 dimensions selon le système de DENT¹. La β -alanine apparaît en bleu clair au réactif à la ninhydrine.

Les résultats relatifs à la présence de β -alanine dans les tissus étudiés sont indiqués dans le tableau suivant:

	Acides aminés libres	Fraction peptidique	Fraction protéique
Racines de scorsonère . . .	+	+	—
Crown-gall scorsonère . . .	—	+	—
Crown-gall topinambour . .	+	+	—
Feuilles de blé	—	+	—
Feuilles de bryophyllum . .	—	+	—

On retrouve ainsi les données antérieurement acquises: présence occasionnelle de β -alanine parmi les acides aminés libres, absence totale parmi les acides aminés d'origine protéique. De plus, on peut remarquer qu'elle est toujours présente dans la fraction peptidique. D'après VIRTANEN² la β -alanine libre proviendrait de la décarboxylation de l'acide aspartique. VIRTANEN et MIETTINEN³ pensent aussi que, dans la fraction peptidique, la β -alanine serait liée à des sucres réducteurs par son groupe NH_2 devenu plus réactif du fait de son éloignement du groupe carboxyle. On peut émettre également l'hypothèse qu'il s'agit de la β -alanine constitutive de l'acide panthoténique entrant lui-même dans la composition du «coenzyme A».

MARIE LOUISE CHAMPIGNY et
C. LIORET

Laboratoire de Photosynthèse, Centre national de la Recherche scientifique, Gif-sur-Yvette, le 28 mai 1955.

Summary

β -alanine has always been found in peptide hydrolysates of various higher plants, but never in protein hydrolysates. An assumption that the β -alanine so found is a constituent of coenzyme A has been suggested.

¹ C. E. DENT, *Biochem. J.* **43**, 169 (1948).

² A. I. VIRTANEN, *Nature* **142**, 674 (1938).

³ A. I. VIRTANEN et J. K. MIETTINEN, *Biochem. Biophys. Acta* **12**, 181 (1953).

Histochemical Demonstration of Reductase Activity in the Nucleus of Chicken Erythrocyte¹

Recently RUBINSTEIN and DENSTEDT² have demonstrated the presence of Krebs cycle enzymes in the nuclei

of chicken erythrocytes. The work of the above investigators was criticized by STERN and TIMONEN¹ who were concerned with a possible contamination of the nuclear preparation by postulated cytoplasmic particles or with a possible absorption by the isolated nuclei of cytoplasmic enzymes made soluble through freezing-thawing techniques. The interesting original work and the subsequent criticism led us to examine these nuclei histochemically for the presence of enzymes concerned with reductase activity.

Histochemical work, using basic techniques previously described³, confirms the actual presence of general reductase and specifically of succinic dehydrogenase activity in the nuclei of chicken erythrocytes.

Four tetrazolium salts were tested: 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC); 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INTC); 2,2'-(p-diphenylene)-bis-2-(3,5-diphenyl) tetrazolium chloride, or neotetrazolium (NT); and 3,3'-dianisole-bis-4,4'-(3,5-diphenyl) tetrazolium chloride, or blue tetrazolium (BT)³.

The first two are monotetrazolium, the latter ditetrazolium compounds. The concentrations used were 1 mg/ml. The different salts varied not as much in the final results as in the time of incubation required to obtain formazan pigment. The INTC was preferred as it gave faster reduction and more minute granulation. Purification of the tetrazolium salts by removal of contaminating metal by previous treatment with a chelating agent, diphenylthiocarbazone, was very effective in decreasing the time of incubation, particularly in the case of the INTC.

Different methods, whose characteristics will be discussed elsewhere, were used in order to achieve satisfactory histochemical results. The reaction was performed both in intact cells as well as in nuclei, which were isolated by freezing and thawing. Freezing and thawing were used for demonstration of succinic dehydrogenase as freezing destroys the so called "endogenous" dehydrogenase.

Potassium cyanide and versene (tetrasodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid) at concentrations from 0.01 M to 0.1 M proved to be very effective on the final histochemical result, probably by affecting the membrane permeability⁴ and enhancing the enzymatic activity⁵.

The specificity of the mechanism involved in the reduction was confirmed by absence of formazan formation in the case of succinic dehydrogenase on leaving out the succinate or on adding fluoride or malonate in addition to succinate.

Results under each test condition were highly reproducible and the number of formazan crystals per cell was fairly uniform. The crystals were localized at the inner surface of the nuclear membrane; and only very rarely were crystals encountered at the center of the nucleus. No tetrazolium reduction was observed with or without succinate in the cytoplasm of the intact cell, as well as in the supernatant fluid from which nuclei had been isolated.

¹ H. STERN and S. TIMONEN, *J. Gen. Physiol.* **38**, 41 (1954).

² B. PEARSON and V. DEFENDI, *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 248 (1954). — V. DEFENDI and B. PEARSON, *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 61 (1955).

³ Obtained from the Pal Chemicals Limited, London, England.

⁴ S. R. MERKEL and W. J. NICKERSON, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **39**, 1008 (1953).

⁵ S. M. ALTMANN and E. M. CROOK, *Nature* **171**, 76 (1953).

¹ This work was supported in part by a Research Grant from the National Cancer Institute, U. S. Department of Health, Education and Welfare, and in part by an Institutional Grant to the Detroit Institute of Cancer Research from the American Cancer Society.

² D. RUBINSTEIN and O. F. DENSTEDT, *J. Biol. Chem.* **204**, 623 (1953).

This is the first time, as far as it is known to the authors, that succinic dehydrogenase has been demonstrated histochemically under conditions in which no mitochondrial bodies are present. It is most remarkable that, in a cell whose cytoplasm has assumed a unique, highly specialized function, the nucleus, which is in a continuous resting phase, displays metabolic activities that are usually associated with the cytoplasm in other tissues.

V. DEFENDI and B. PEARSON

Detroit Institute of Cancer Research, Detroit 1, Michigan, April 26, 1955.

Zusammenfassung

Dehydrase- und Succinodhydraseaktivität werden mittels histochemischer Methode durch Tetrazoliumsalze in Kernen der Hühnererythrocyten dargestellt. Das Vorhandensein der Formazankristalle beschränkt sich vor allem auf die innere Oberfläche der Kernmembrane. Die Bedeutung dieser Entdeckungen im Zusammenhang mit dem Succinodhydrase-Mitochondrien-Verhältnis wird kurz besprochen.

Etude histochimique de l'action des rayons X sur les cholinestérases

On sait depuis longtemps¹ que les globules rouges possèdent de l'acétylcholinestérase (AChE = cholinestérase spécifique ou vraie). Mais ce n'est que depuis les travaux de ZAJIČEK et de ROGISTER² qu'on connaît la présence de cet enzyme dans les éléments qui sont à l'origine des cellules sanguines, à savoir les érythroblastes et les mégacaryocytes, et aussi dans les thrombocytes³.

Chez l'homme, on trouve cette estérase presque exclusivement dans les érythrocytes, où elle serait localisée sur la membrane⁴, et dans les érythroblastes, tandis que chez le chat, elle se trouve dans le protoplasme des mégacaryocytes et des plaquettes. Chez la souris, animal qui a servi à nos expériences, l'enzyme est peu actif dans la lignée érythrocytaire et fort actif dans la lignée thrombocytaire.

On ignore le rôle de l'AChE dans les éléments sanguins. On suppose qu'elle intervient pour maintenir la perméabilité de la membrane cellulaire, car l'inhibition par la physostigmine provoque une modification de la perméabilité et de l'échange des ions sodium et potassium⁵.

En partant du fait que la perturbation de perméabilité cellulaire est une des premières manifestations du syn-

drome d'irradiation¹, nous avons cherché à déterminer l'influence des rayons X sur les cholinestérases des éléments hématopoïétiques et des cellules du sang. Dans ce dernier, l'AChE des hématies échappe à l'analyse histochimique, sans doute à cause de l'état dispersé de l'enzyme dans ces éléments. D'autre part, les plaquettes sont moins favorables à l'étude histochimique que les mégacaryocytes. Nous avons donc examiné l'activité acétylcholinestérasique des mégacaryocytes dans la rate et la moelle osseuse chez des souris de race C3H (mâles de 6 mois). Dans une série d'expériences, nous avons observé aussi l'activité de cet enzyme dans les plaques motrices du muscle strié. Quant à la cholinestérase (ChE = cholinestérase non spécifique ou pseudo-cholinestérase), celle du sérum ne peut être mise en évidence par notre technique, et nous avons dû utiliser des coupes de divers organes (foie, pancréas, prostate) pour définir l'effet de l'irradiation sur cet enzyme.

Les animaux ont été irradiés au moyen d'un appareil «Siemens» (250 kV, 20 mA, 0,5 Cu, champ 15 × 15 cm, intensité 80 r/min) avec contrôle au dosimètre «Siemens». Les doses d'irradiation et les temps de survie accordés aux animaux sont indiqués dans le graphique. Certaines souris ayant reçu 800 ou 600 r ont été laissées en vie plus longtemps: jusqu'à 20 jours après l'irradiation. La dose mortelle pour nos souris est de 750 r.

La détermination d'activité cholinestérasique est faite suivant la méthode de KOELLE modifiée par GEREBTZOFF². Pour chaque organe, les coupes ont été incubées en présence d'acétylthiocholine ou de butyrylthiocholine durant 30 à 120 min. L'estimation d'activité enzymatique se fait d'après l'intensité de la coloration. Elle est, par conséquent, subjective, et ne donne qu'une idée imprécise des variations quantitatives.

L'ensemble des résultats est indiqué dans le graphique.

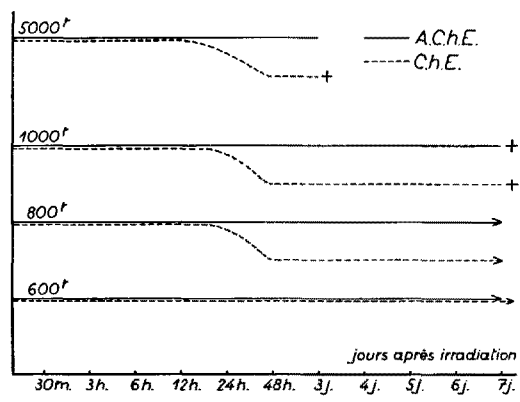


Fig. 1.

L'AChE des mégacaryocytes de la rate et de la moelle osseuse et aussi celle des plaques motrices est très résistante aux rayons X, même à la dose de 5000 r. On n'a pas constaté de diminution de leur activité même quand les mégacaryocytes présentent de grandes altérations dans leur structure cellulaire (vacuolisation et désintégration du noyau). L'activité de l'AChE disparaît en même temps que s'éliminent les débris de mégacaryocytes, c'est-à-dire au bout de 2 jours pour 5000 r, vers le 5^e jour pour 1000 r, et au-delà d'une semaine pour 800 r. Après une dose de 600 r, les mégacaryocytes et l'activité enzymatique persistent. Quelle que soit la dose,

¹ J. FEGLER, H. KOWARZYK et J. SZPUNAR, Bull. int. Acad. polon. Sci. cl. Méd. 7, 517 (1937). - G. A. ALLES et R. C. HAWES, J. biol. Chem. 133, 375 (1940). - D. RICHTER et P. G. CROFT, Biochem. J. 36, 746 (1942).
² J. ZAJIČEK et N. DATTA, Acta Haemat. 9, 115 (1953). - J. ZAJIČEK, B. SYLVEN et N. DATTA, J. Histochem. and Cytochem. 2, 115 (1954). - J. ZAJIČEK, Acta Haemat. 12, 238 (1954). - G. ROGISTER, C. r. Soc. Biol. 148, 1900, 1910 (1954).
³ J. ZAJIČEK et N. DATTA, Acta Haemat. 9, 115 (1953). - J. ZAJIČEK, B. SYLVEN et N. DATTA, J. Histochem. and Cytochem. 2, 115 (1954). - J. ZAJIČEK, Acta Haemat. 12, 238 (1954). - G. ROGISTER, C. r. Soc. Biol. 148, 1900, 1910 (1954). - K. B. AUGUSTINSSON, N. DATTA, M. GRAHN et J. ZAJIČEK, Nature 169, 800 (1952). - J. ZAJIČEK et N. DATTA, Acta haemat. 7, 39 (1952).
⁴ P. G. CROFT et D. RICHTER, J. Physiol. 102, 155 (1943).
⁵ K. B. AUGUSTINSSON in *The enzymes* by J. B. SUMNER and MYRBÄCK, vol. 1 (Academic Press, New-York 1950). - W. C. HOLLAND et M. E. GREIG, Amer. J. Physiol. 162, 610 (1950). - M. E. GREIG et W. C. HOLLAND, Arch. Biochem. 23, 370 (1949).

¹ Z. M. BACQ et P. ALEXANDER, *Principes de Radiobiologie* (Masson, Paris 1955).
² M. A. GEREBTZOFF, Acta Anat. 19, 366 (1953).