

content of the aerial parts suggests, as for the trees, that there is some possibility of its being eliminated. Furthermore carrot taproots, potato tubers, narcissus bulbs and whole onion plants were first washed several times and then moved to unpulled soil. 4 months after this transplantation (10 months for narcissus bulbs) the whole plants were harvested and analyzed for dioxine content in both aerial and underground organs. Data showed the disappearance of dioxine during this period from the underground organs and from aerial organs of old formation,

and its absence from newly-formed aerial parts (table 2). If we exclude the possibility of the dioxine having been transported backward to the soil, we may formulate 3 hypotheses: translocation of dioxine to aerial parts followed by photochemical degradation due to sunlight, as suggested by Crosby's findings; translocation from underground to aerial organs and dispersion of the pollutant into the external environment by transpiration; metabolization by the plant. Experiments are now being carried out to test these hypotheses.

- 1 Acknowledgment. This research was sponsored by the Regional Government of Lombardy, Italy. The authors would like to thank Prof. Marré for his continuous interest and for the fruitful discussion.
- 2 A. Hay, *Nature* 262, 623 (1976).
- 3 H. Baver, K. H. Schultz and U. Spiegelberg, *Arch. Gewerbeopath. Gewerbehyg.* 18, 538 (1961).
- 4 C. R. Higginbotham, A. Huang, D. Firestone, J. Verret, J. Ress and A. D. Campbell, *Nature* 220, 702 (1968).
- 5 A.R. Isensee and G.E. Jones, *J. agric. Fd Chem.* 19, 1210 (1971).
- 6 D.G. Crosby and A.S. Wong, *Science* 195, 1337 (1977).
- 7 R.W. Baughman and M. Meselson, *Envir. Hlth Persp.* 5, 27 (1973).
- 8 R.W. Baughman, Thesis Harvard University Cambridge, Mass. 1974.
- 9 A. Cavallaro, G. Colli, A. Gorni, G. Invernizzi and L. Luciani, *Boll. Chim. Lab. Prov.*, in press (1979).

## Effet du ribonucléate de sodium sur la croissance et l'activité hémolytique de *Treponema hyodysenteriae*

### Effect of sodium ribonucleate on the growth and the hemolytic activity of *Treponema hyodysenteriae*

B. Picard, L. Massicotte et S.A. Saheb<sup>1</sup>

Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe (Québec, Canada H7N 7C6), et Centre de recherche en Bactériologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec (Québec, Canada H7N 4Z3), 31 juillet 1978

**Summary.** Liquid cultures of different strains of *Treponema hyodysenteriae*, when supplemented with sodium ribonucleate show an increase in the hemolytic activity titers while the number of colony forming units remain constant.

Un spirochète anaérobie, *Treponema hyodysenteriae*, est reconnu à l'heure actuelle comme l'agent étiologique primaire de la dysenterie porcine<sup>2-4</sup>. Ce tréponème diffère des autres tréponèmes cultivables *in vitro* non seulement par le fait qu'il est pathogène, mais aussi parce qu'il est hémolytique. Récemment, certains auteurs<sup>5,6</sup> ont démontré que les pores sont porteurs d'un tréponème qui, par sa morphologie et sa mobilité, est confondu avec *T. hyodysenteriae*. Les seuls critères permettant de différencier ces 2 types de tréponèmes sont le pouvoir entéropathogène et le patron hémolytique observé sur des géloses au sang. Selon ce dernier critère, on peut différencier les souches de tréponèmes en fortement et faiblement  $\beta$ -hémolytiques. Il a été démontré qu'il existe une corrélation positive entre le pouvoir hémolytique et l'entéropathogénicité des souches<sup>6</sup>; seules celles fortement  $\beta$ -hémolytiques sont entéropathogènes. Des études préliminaires nous ont permis de mettre en évidence que cette activité hémolytique, insensible à l'oxygène, était produite en milieu liquide. En nous inspirant de travaux effectués avec la streptolysine S<sup>7</sup> et l'aérolysine<sup>8</sup> nous avons testé l'effet du ribonucléate de sodium sur la production de cette activité hémolytique, car l'obtention d'un titre hémolytique élevé est une condition préalable à tout essai ultérieur de purification. Les résultats ayant permis de démontrer que le ribonucléate de sodium augmentait la production de l'activité hémolytique, nous avons donc recherché la concentration optimale de ribonucléate pour la production de cette activité ainsi que son influence sur la croissance des tréponèmes.

**Matériel et méthodes.** Les souches de tréponèmes utilisées sont les suivantes: *T. hyodysenteriae* ATCC 27164, PM<sub>9</sub> et PA<sub>2</sub>. Les souches PM<sub>9</sub> et PA<sub>2</sub> ont été isolées dans nos

laboratoires à partir du colon d'un porc mort de dysenterie (PM<sub>9</sub>) et de matières fécales provenant d'un porc sain (PA<sub>2</sub>). L'isolement des souches a été effectué sur milieu Trypticase Soy Agar (TSA, Baltimore Biological Lab., USA) additionné de 5% de sang bovin citraté et de 400 µg par ml de chloro-pentahydrate de spectinomycine (Upjohn Co.) tel que décrit par Songer et al.<sup>9</sup>. Sur ce milieu, les souches ATCC 27164 et PM<sub>9</sub> apparaissent fortement  $\beta$ -hémolytiques alors que la souche PA<sub>2</sub> est faiblement  $\beta$ -hémolytique. Les souches sont maintenues par repiquages sur le même milieu TSA sans spectinomycine et incubation à 37°C dans des jarres anaérobies Gas pak contenant une atmosphère de 80% d'H<sub>2</sub> et 20% de CO<sub>2</sub>, tel que décrit par Kinyon et Harris<sup>10</sup>, ou en bouillon SB-BHI composé de parties égales des milieux Spirolate (SB, Baltimore Biological Lab.) et Brain Heart Infusion (BHI, Baltimore Biological Lab.) tel que décrit par Saheb et Richer-Massicotte<sup>11</sup>. Les milieux sont pré-réduits et stérilisés dans une atmosphère d'azote désoxygéné tel que décrit par Kinyon et Harris<sup>10</sup>. Avant l'emploi on rajoute aux milieux 10% de sérum de veau fétal (Grand Island Biological Co.) inactivé 30 min à 56°C. Les précultures sont préparées en ensemencant 10 ml de milieu liquide avec une colonie isolée, prélevée sur une gélose au sang, et incubation à 37°C. A partir de précultures de 4 jours on ensemence, en utilisant des inocula d'un ml, des volumes de 20 ml des milieux décrits plus haut contenant, le cas échéant, du ribonucléate de sodium (*Torula* yeast, Sigma) stérilisé par filtration. On suit la croissance à intervalles réguliers par un comptage d'unités viables qui est effectué par étalement de volumes appropriés des dilutions convenables en PBS (tampon phosphate 50 mM, pH 7,0; NaCl 140 mM) sur des géloses

Tableau 1. Effet du ribonucléate de sodium sur la croissance et l'activité hémolytique de *T. hyodysenteriae* en milieu TSB

Souche	Temps (jours)	Croissance (unités viables/ml)*			Activité hémolytique (UH/ml)		
		Concentration de ribonucléate de sodium (%)	0	0,5	1,0	0	0,5
ATCC 27164	0	N.D.**	N.D.	N.D.	N.D.	0	0
	1	$1,3 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	8	7	11
	2	N.D.	N.D.	N.D.	19	256	609
	3	$3,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	27	716	1300
	4	$0,9 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$0,9 \times 10^8$	0	38	84
	5	N.D.	N.D.	N.D.	0	0	0
PM <sub>9</sub>	0	N.D.	N.D.	N.D.	0	0	0
	1	$0,5 \times 10^6$	$0,2 \times 10^6$	$0,4 \times 10^6$	13	13	6
	2	N.D.	N.D.	N.D.	28	59	872
	3	$4,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	N.D.	9	315	604
	4	$2,8 \times 10^7$	$8,6 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	0	32	86
	5	N.D.	N.D.	N.D.	0	0	0
PA <sub>2</sub>	0	N.D.	N.D.	N.D.	0	0	0
	1	$3,6 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	0	0	0
	2	$3,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$7,3 \times 10^6$	0	0	0
	3	$3,6 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	0	220	492
	4	$8,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	0	132	350
	5	$2,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$	$7,3 \times 10^7$	0	96	310

\* Unités cellulaires totales par ml, dans le cas de la souche PA<sub>2</sub>. \*\* Non déterminé.Tableau 2. Effet du ribonucléate de sodium sur la croissance et l'activité hémolytique de *T. hyodysenteriae* en milieu SB-BHI

Souche	Temps	Croissance (unités viables/ml)*			Activité hémolytique (UH/ml)		
		Concentration de ribonucléate de sodium (%)	0	0,5	1,0	0	0,5
ATCC 27164	0	$2,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$0,5 \times 10^5$	0	0	0
	1	$1,1 \times 10^6$	N.D.**	N.D.	8	13	20
	2	$0,8 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	18	123	292
	3	$1,9 \times 10^7$	N.D.	N.D.	15	317	1495
	4	$1,6 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	19	112	210
	5	N.D.	N.D.	N.D.	0	0	0
PM <sub>9</sub>	0	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	0	0	0
	1	$4,7 \times 10^5$	N.D.	N.D.	10	1	2
	2	$3,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	32	21	61
	3	$4,8 \times 10^7$	N.D.	N.D.	19	216	756
	4	$7,7 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	4	484	773
	5	N.D.	N.D.	N.D.	0	172	0
PA <sub>2</sub>	0	$< 1,0 \times 10^5$	$< 1,0 \times 10^5$	$< 1,0 \times 10^5$	0	0	0
	1	N.D.	N.D.	N.D.	0	0	0
	2	$3,3 \times 10^5$	N.D.	$6,6 \times 10^5$	0	0	0
	3	$1,0 \times 10^6$	$8,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$	0	0	0
	4	$1,3 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	7	97	296
	5	$1,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$7,3 \times 10^6$	2	67	146

\* Unités cellulaires totales par ml, dans le cas de la souche PA<sub>2</sub>. \*\* Non déterminé.

au sang identiques à celles utilisées pour le repiquage de la souche. Après incubation à 37 °C, durant 4-6 jours, en jarres Gas pak, comme décrit plus haut, on compte les zones d'hémolyse en considérant que chacune représente une unité viable. Dans le cas de la souche PA<sub>2</sub> pour laquelle un comptage d'unités viables est impossible, dû à sa croissance diffuse sur milieu solide, une évaluation des unités cellulaires est effectuée par le comptage des cellules en microscopie optique, à l'aide d'une chambre de Petroff-Hauser<sup>12</sup>. Parallèlement au comptage d'unités viables, on dose l'activité hémolytique dans les filtrats de culture. La méthode utilisée est celle décrite par Bernheimer et Schwartz<sup>13</sup>. Le milieu réactionnel contient 1 ml de dilutions en série, en PBS, de l'échantillon à doser, auquel on ajoute 1 ml d'une suspension d'hématies de lapin à 1,5% dans du PBSA (PBS avec 0,1% p/v d'albumine). Une unité hémolytique (UH) est la dilution de toxine capable de lyser 50% de ces hématies en 60 min à 37 °C. Le titre hémolytique d'une

solution est l'inverse de cette dilution; il est évalué suivant la méthode de Cooper et coll.<sup>14</sup>.

**Résultats et discussion.** Comme on peut le voir du tableau 1, la croissance des souches ATCC 27164, PM<sub>9</sub> et PA<sub>2</sub> en milieu TSB ne semble pas être affectée par la présence du ribonucléate de sodium, les comptages ne révélant aucune différence significative. En ce qui concerne l'activité hémolytique, on note que, nulle au départ, elle augmente pour atteindre un maximum au 3e jour, après quoi elle décroît rapidement. A son maximum de production, l'activité hémolytique pour les souches ATCC 27164 et PM<sub>9</sub> montre une augmentation par un facteur de 50 en présence du ribonucléate à 1%, par rapport à la culture témoin. Dans le cas de la souche PA<sub>2</sub>, on peut noter que l'activité hémolytique, nulle en absence de ribonucléate, atteint au 3e jour 220 et 492 UH par ml en présence de 0,5 et 1% de ribonucléate de sodium et qu'elle décroît plus lentement que dans le cas des 2 souches précédentes. En ce qui concerne les

résultats obtenus avec le milieu SB-BHI (tableau 2), ils sont comparables à ceux obtenus en milieu TSB. Ainsi, on ne note aucun effet du ribonucléate de sodium sur la croissance des souches ATCC 27164, PM<sub>9</sub> et PA<sub>2</sub> et, alors que l'activité hémolytique de la souche ATCC 27164 augmente d'un facteur de 100 en présence de 1% de ribonucléate de sodium, dans le cas des souches PM<sub>9</sub> et PA<sub>2</sub> ce facteur est de 40. Enfin, il faut noter que les maxima d'activité dans le cas des souches PM<sub>9</sub> et PA<sub>2</sub> se situent au 4<sup>e</sup> jour comparativement au 3<sup>e</sup> dans le cas du milieu TSB. Dans les 2 milieux l'utilisation de ribonucléate à une concentration de 1,5% inhibe complètement la croissance. Il appert donc de ces résultats que les milieux TSB et SB-BHI se comparent avantageusement pour la croissance des différentes souches de tréponèmes et que le ribonucléate de sodium à une concentration de 1% permet d'augmenter considérablement aussi bien l'activité hémolytique des souches fortement  $\beta$ -hémolytiques que des faiblement  $\beta$ -hémolytiques. L'effet du ribonucléate de sodium sur la production de l'activité hémolytique par ces souches n'est pas sans rappeler celui observé dans le cas de la streptolysine S des streptocoques du groupe A<sup>7</sup> et de l'aérolysine<sup>8</sup>. Si on ne connaît pas encore le rôle, au niveau moléculaire, de ce composé vis-à-vis l'aérolysine, on sait, par contre, que dans le cas de la streptolysine S, il agirait en premier lieu en libérant cette toxine de la surface des cellules et lui servirait ensuite de transporteur<sup>7</sup>. Des essais préliminaires ont démontré que l'addition de ribonucléate de sodium au surnageant d'une culture de *T. hyodysenteriae* ATCC 27164 effectuée en absence de ce composé, n'entraîne aucune augmentation de l'activité hémolytique ni de sa stabilité à la température.

Ces observations, jointes à celle du rendement cellulaire inchangé des cultures en présence de ribonucléate de sodium, posent la question du mécanisme par lequel ce composé entraînerait l'augmentation de l'activité hémolytique de ces tréponèmes.

- 1 A qui toute correspondance doit être adressée.
- 2 R. D. Glock et D. L. Harris, *Vet. Med., Sm. Anim. Clin.* 67, 65 (1972).
- 3 D. L. Harris, R. D. Glock, C. R. Christensen et J. M. Kinyon, *Vet. Med., Sm. Anim. Clin.* 67, 61 (1972).
- 4 D. J. Taylor et T. J. L. Alexander, *Br. vet. J.* 127, 58 (1971).
- 5 M. J. Hudson, T. J. L. Alexander et R. J. Lyons, *Vet. Rec.* 98, 498 (1976).
- 6 J. M. Kinyon, D. L. Harris et R. D. Glock, *Infect. Immun.* 15, 638 (1977).
- 7 L. Ginsburg, in: *Microbial Toxins*, vol. IV, p. 99. Academic Press, New York 1970.
- 8 A. W. Bernheimer et L. S. Avigad, *Infect. Immun.* 9, 1016 (1974).
- 9 J. G. Songer, J. M. Kinyon et D. L. Harris, *J. clin. Microbiol.* 4, 57 (1976).
- 10 J. M. Kinyon et D. L. Harris, *Vet. Rec.* 95, 219 (1974).
- 11 S. A. Saheb et R. Richer-Massicotte, *Rev. Can. Biol.* 31, 153 (1972).
- 12 G. G. Meynell et E. Meynell, in: *Theory and practice in experimental bacteriology*, 2nd ed., p. 19. Cambridge University Press 1970.
- 13 A. W. Bernheimer et L. L. Schwartz, *J. gen. Microbiol.* 30, 455 (1963).
- 14 L. F. Cooper, M. A. Madoff et L. Weinstein, *J. Bact.* 87, 127 (1964).

## Increased activity of the ribosomal dissociation factor in the pre-replicative phase of liver regeneration after partial hepatectomy

R. Comolli, A. Schubert, M. Cojazzi and L. Riboni<sup>1</sup>

*Centro di Studio per la Patologia cellulare del C.N.R. and Istituto di Patologia generale, Università di Milano, via Mangiagalli, 31, I-20133 Milano (Italy), 19 July 1978*

**Summary.** The activity of the ribosomal dissociation factor and the formation in vitro of free 60S and 40S subunits increased in the first 12–48 h after partial hepatectomy. This suggests an accelerated reconversion into active subunits of ribosomes that complete a translation cycle in the early phases of liver regeneration.

Following the partial surgical removal of rat liver, a decreased rate of protein degradation might account for at least part of the increased rate of protein accumulation in this condition<sup>2</sup>. The liver shows an increased amino acid incorporation into protein during regeneration<sup>3, 4</sup> and the ribosomes occur mainly in the form of polyribosomes<sup>5–7</sup>. In conditions of accelerated synthesis of proteins, the activity of the soluble protein factors involved in the initiation reactions of polypeptide chain formation is found to increase<sup>8–10</sup>. One of the protein factors, the eIF-3 (or DF) factor<sup>11, 12</sup>, prevents the association of 60S and 40S subunits into 80S monomers and promotes 80S monomer ribosome dissociation into subunits<sup>11–16</sup>.

The dissociation of ribosome monomers into subunits is a prerequisite for the initiation of protein synthesis<sup>17, 18</sup>. In the present work we have studied the activity of this factor, extracted by high-salt wash from ribosomes and from the cell sap of rat liver, at 12, 24, 48 and 72 h after partial hepatectomy and sham-operation and in intact control rats of same age.

**Material and methods.** Male Wistar rats weighing 250–300 g (5–6 months old) fed ad libitum until death and housed with fixed artificial illumination from 07.00 to 19.00 h, were

used. 4–6 animals per experiment were submitted to partial hepatectomy (67%)<sup>19</sup> between 09.30–11.00 h; 2 animals per experiment were employed for sham-operation and palpation of the liver. Rats were killed by cervical dislocation and bled. Control rats were killed at the same day period (09.30–11.00 h). The livers were excised, weighed and homogenized at 0–4°C in 20 mM tris-Cl buffer, pH 7.6, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM Mg acetate, 2 mM mercaptoethanol (MSH), 0.2 M sucrose. Ribosomes and the cell sap were obtained and purified by conventional methods<sup>9, 20, 21</sup>.

The extraction of the dissociation factor from ribosomes and from the cell sap was as reported previously<sup>20, 22</sup>. Ribosomes were suspended in high-salt medium (10 mM tris-Cl buffer, pH 7.6, 0.5 M KCl, 10 mM MSH) and the ribosomal protein containing the factor extracted. The KCl extract was centrifuged at 100,000 × g, brought to 30% (40% for cell sap) saturation with ammonium sulphate and then to 70% saturation. The 70% precipitate was suspended in 10 mM tris-Cl buffer, pH 7.6, 100 mM KCl, 0.3 mM Mg acetate, 2 mM MSH, dialyzed against this buffer and applied to a 1.5 × 10 cm DEAE-cellulose (Whatman DE 23) column, equilibrated with this buffer with KCl increased to 120 mM. The factor activity was eluted with the