

Vorversuche haben gezeigt, dass sich die gleiche Technik auch beim neugeborenen Ferkel anwenden lässt. Bei diesem Tier ist der Confluens sinuum, wie übrigens auch beim menschlichen Neugeborenen, wesentlich grösser als beim ausgewachsenen Kaninchen, was die Gefahr der Läsion der hirnwärts gelegenen Wände diese Blutleiters beim Durchbohren durch den Knochen vermindert<sup>13</sup>.

**Summary.** Since an adequate venous blood outflow from the internal jugular vein is not available in the rabbit, a method for venous blood outflow from the Confluens sinuum was developed. It appeared to be useful in experiments with partial extracorporeal circulation and for par-

tial oxygenation of the blood circulation during haemodialysis.

TH. KOLLER JR.,  
M. MONNIER und R. GAMP

*Physiologisches Institut der Universität, Basel, und  
Universitätsfrauenklinik, Basel, (Schweiz),  
22. November 1963.*

<sup>13</sup> Besonderer Dank gilt den Herren S. GRABER und H. BITTERLI aus dem Physiologischen Institut sowie Herrn E. DÖBELI aus der Universitätsfrauenklinik für ihre wertvolle Mitarbeit.

## STUDIORUM PROGRESSUS

### Action de la piqûre et de l'eau distillée sur le développement de l'embryon de poulet<sup>1</sup>

Nous nous occupons depuis quelque temps de l'action biologique de certains métabolites et antimétabolites et avons porté tout particulièrement notre attention sur l'antivitamine B<sub>6</sub> ou désoxypyridoxine, en essayant l'action de cette substance sur le développement de l'embryon de poulet et sur des organes d'embryon de poulet cultivés *in vitro*. La désoxypyridoxine dissoute dans de l'eau distillée, dans de l'eau physiologique ou dans du liquide de tyrode a été injectée à des doses variables dans le blanc ou dans le jaune de l'œuf. Les premiers résultats de ces recherches nous ont permis de constater que l'embryon de poulet est très polymorphe dans ses réponses aux différentes stimulations qui s'exercent sur lui, qu'il est d'une extrême sensibilité, même vis-à-vis des stimulations minimales – la réponse est parfois disproportionnée à l'intensité du stimulus – et qu'il réagit vivement aux variations, mêmes très petites, du milieu d'incubation (température, humidité).

Pour nous mettre à l'abri des facteurs pouvant interférer au cours d'une expérience, avec l'action de la substance employée, et en particulier des facteurs représentés d'une part par l'action du solvant dans lequel la substance est dissoute et d'autre part par l'action mécanique traumatique de la piqûre, nous essayons de mettre au point une méthode standard qui, pour les substances hydro-solubles, nous permette de séparer l'action de la substance de celle de ces deux autres facteurs.

Dans la littérature, nous avons trouvé très peu de données concernant l'action de l'eau distillée sur le développement de l'embryon de poulet. FÉRÉ<sup>2</sup>, en 1893 et 1896, a fait quelques expériences analogues aux nôtres. En injectant  $\frac{1}{2}$  cm<sup>3</sup> d'eau distillée dans le blanc de l'œuf de poule et en ouvrant les œufs après 3 jours d'incubation, il a trouvé 1 embryon malformé (10%). Cet auteur a répété trois ans plus tard les expériences mais sur un matériel plus vaste et avec des quantités plus petites d'eau; en injectant  $\frac{1}{20}$  cm<sup>3</sup> d'eau distillée dans le blanc de 72 œufs et en les ouvrant après trois jours d'incubation, il a trouvé les 70,8% d'embryons normaux et les 29,2% d'embryons malformés. D'ailleurs, FÉRÉ n'insiste pas sur ces résultats qui lui avaient servi uniquement comme expériences de contrôle pour essayer l'influence des injections de peptone sur l'évolution de l'embryon. ANCEL<sup>3</sup> a observé que la déposition d'une goutte d'eau distillée directement sur l'embryon, mis à nu après 20 h d'incubation, fait aug-

menter l'effet léthal et l'effet tératogène, qui sont d'ailleurs déjà manifestes par la simple ouverture de l'œuf au moyen d'un petit orifice pratiqué dans la coquille. Mais les expériences d'ANCEL ont été conduites dans un but différent du nôtre et en se servant d'une technique toute particulière; elles ne nous semblent pas démonstratives pour éclairer le problème que nous nous sommes proposés d'étudier.

Nos expériences ont été faites sur un ensemble de 1400 embryons de poulet. Nous avons réalisé 5 séries d'expériences en faisant varier les conditions expérimentales dans chacune d'elles. Les 4 premières ont trait aux effets de l'eau distillée injectée dans le blanc de l'œuf avec une micro-seringue à des doses de  $\frac{1}{20}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{2}$  et 1 cm<sup>3</sup>; l'eau a été injectée avant l'incubation et après 1, 2, 3, 4, et 5 jours d'incubation. A côté d'œufs ayant subi des injections d'eau distillée, nous avons mis en couveuse des œufs de contrôle qui n'avaient subi aucun traitement et également d'autres œufs que nous avons piqués avec la même seringue, dans le même endroit et en suivant exactement la technique employée pour les injections (série V). La piqûre des œufs a été faite afin de voir si ce petit traumatisme peut, pour sa part, provoquer des effets nuisibles et, le cas échéant, pour séparer ces effets de ceux déterminés par l'injection de l'eau; en effet, lorsque l'on injecte de l'eau distillée, il faut tenir compte de 2 facteurs, l'action de l'eau et l'action de la piqûre. Les Tableaux montrent mieux que toute description, les résultats principaux de ces séries d'expériences<sup>4</sup>.

Le Tableau I nous montre le comportement de l'embryon de poulet dans les trois premiers jours qui suivent le traitement; dans nombre de cas, une réaction immédiate se manifeste et se traduit par la mort de l'embryon. Les chiffres des colonnes indiquent le nombre en pour-cent des morts; puisqu'il s'agit d'une mort qui intervient tout de suite après le traitement, nous pouvons considérer celui-ci comme la cause de la mort des embryons. Le Tableau nous

<sup>1</sup> Ces recherches ont été faites grâce à un subside du Fonds National Suisse de la recherche scientifique et de la Fondation E. Barell.

<sup>2</sup> Ch. FÉRÉ, C. R. Soc. Biol. 45, 787 (1893); 48, 424 (1896).

<sup>3</sup> P. ANCEL, Arch. Anat. micr. Morph. exp. 45, 203 (1956).

<sup>4</sup> Nous sommes en train de répéter toutes les expériences avec une variante: au lieu de l'eau distillée, nous injectons de l'eau physiologique ou du liquide de tyrode. Les résultats de ces expériences feront l'objet de communications ultérieures.

offre l'occasion de faire quelques considérations: tout d'abord, nous sommes peut-être frappés par le nombre assez élevé de morts (7%) déjà dans les œufs de contrôle qui n'ont subi aucun traitement. Mais ce chiffre doit être considéré comme très approximatif. En effet, dans des séries précédentes de contrôle nous avons obtenu des chiffres nettement inférieurs (2%); d'autre part l'expérience acquise sur le comportement de l'œuf de poule au cours de l'incubation nous conduit à penser que des séries de contrôle répétées à différentes reprises ne donneraient presque jamais de résultats équivalents.

La deuxième colonne du Tableau I montre la mortalité en % des embryons simplement piqués dans le blanc, mais n'ayant pas reçu d'injection d'eau distillée. Les chiffres nous indiquent que la piqûre de l'œuf au niveau de l'albumen n'est pas une stimulation traumatique suffisante pour provoquer la mort précoce des embryons en nombre important. En effet, si la piqûre est faite avant l'incubation ou 24 h après, le % des morts correspond à ce qu'on observe chez des œufs de contrôle; si la piqûre est faite un peu plus tardivement (2e-5e jour), ce pourcentage augmente légèrement mais reste dans des valeurs qui rentrent encore dans la normale.

Les quatre dernières colonnes du Tableau I résument les premiers temps de la réaction des embryons vis-à-vis de l'injection de différentes quantités d'eau distillée. La comparaison des chiffres fait ressortir une différence nette entre les deux colonnes de gauche (injection d'une quantité très petite d'eau distillée) et les deux colonnes de droite (injection d'une quantité d'eau qui, pour l'œuf, est très importante). L'injection de  $\frac{1}{20}$  ou  $\frac{1}{10}$  cm<sup>3</sup> d'eau distillée fait augmenter, parfois doubler ou tripler le taux de mortalité, mais le pourcentage reste encore dans des limites relativement modestes. Par contre, l'injection de  $\frac{1}{2}$  cm<sup>3</sup> et, plus encore de 1 cm<sup>3</sup> d'eau distillée hausse d'une manière notable le taux de la mortalité précoce qui atteint, surtout lorsque l'injection de 1 cm<sup>3</sup> d'eau distillée est pratiquée après 4-5 jours d'incubation, des chiffres extrêmement élevés. La comparaison des résultats obtenus par l'injection des différentes quantités d'eau distillée fait ressortir qu'il existe un lien de stricte interdépendance entre l'effet nuisible et la masse de liquide injectée. Si le liquide hypotonique est introduit dans l'œuf en petite quantité, il ne joue pas un rôle important; le nombre des morts est modeste et les embryons restent indifférents à l'injection.

Les chiffres des 4 colonnes, et surtout de celles de droite, montrent que le taux de mortalité augmente au fur et à mesure que l'injection est faite à des stades plus avancés d'incubation. L'une des explications de ce fait pourrait être la suivante: lorsque l'injection de l'eau est faite avant ou tout au début de l'incubation, il n'y a pas de risque de léser les vaisseaux sanguins extraembryonnaires qui ne sont pas encore formés; mais lorsque l'injection est faite à un stade plus avancé, ce risque de lésions vasculaires devient réel et nous avons pu parfois le constater. Une autre explication qui paraît peut-être encore plus plausible est la suivante: la présence des vaisseaux sanguins extraembryonnaires active la pénétration de l'eau distillée dans le courant sanguin; cette pénétration rapide d'un liquide hypotonique déclanche un déséquilibre hydrique important qui entraîne, dans un grand nombre de cas, la mort des embryons.

Le Tableau II montre le nombre en pour-cent des embryons qui sont arrivés vivants au 21<sup>e</sup> jour; il sert à nous indiquer le degré de résistance de l'embryon tout au long de l'incubation et sa capacité d'arriver à l'éclosion: en définitive, le Tableau résume l'action léthale de la piqûre et de l'eau distillée sur le développement de l'embryon de

poulet. Ici encore, on peut faire à peu près les mêmes remarques que pour le Tableau I: la simple piqûre de l'embryon ou l'injection de petites quantités d'eau distillée n'ont pas un effet léthal important puisque, dans l'ensemble, le nombre des embryons arrivés au 21<sup>e</sup> jour est superposable à celui qu'on trouve chez les œufs de contrôle. Les chiffres indiqués dans les deux colonnes de droite montrent que l'injection de  $\frac{1}{2}$  ou 1 cm<sup>3</sup> d'eau distillée provoque une mortalité très importante qui dépasse largement les 50% des œufs en expérience. Dans les deux colonnes de droite, nous voyons encore se répéter le même phénomène signalé dans le Tableau I: la mortalité atteint son maximum lorsque l'injection d'eau distillée est pratiquée au 4e-5e jour d'incubation. Ce Tableau enfin confirme l'importance de la masse de liquide injecté comme facteur léthal et souligne encore une fois que ce n'est pas l'action chimique éventuelle déployée par l'eau distillée, mais que c'est plus vraisemblablement la quantité de l'eau introduite qui joue le rôle prédominant dans le déterminisme de la mort des embryons: en effet, le Tableau montre d'une manière très convaincante qu'en procédant vers la droite le nombre des survivants décroît presque jusqu'à s'annuler.

Le troisième Tableau résume les résultats concernant l'effet tératogène de la piqûre et de l'injection d'eau distillée. Dans l'ensemble, on n'y voit pas de chiffres

Tableau I. Nombre des embryons (%) morts dans les 3 premiers jours après le traitement

Date du traitement	Con-	Piqûre	Injection d'eau distillée	
	trôle		0,05 cm <sup>3</sup> 0,1 cm <sup>3</sup> 0,5 cm <sup>3</sup> 1 cm <sup>3</sup>	
Avant l'incubation	7	4,4	15,4	11,1 35 38,6
Après 24 h		4,4	14,6	11,1 18,5 30,2
Après 48 h		8,5	9,8	11,4 17,5 40,5
Après 3 jours		8,3	4,7	16,7 26,8 48,7
Après 4 jours		5,0	—	2,0 52,6 78,4
Après 5 jours		7,5	46,7	22 58 78

Tableau II. Nombre (en %) des embryons arrivés au 21<sup>e</sup> jour

Date du traitement	Con-	Piqûre	Injection d'eau distillée	
	trôle		0,05 cm <sup>3</sup> 0,1 cm <sup>3</sup> 0,5 cm <sup>3</sup> 1 cm <sup>3</sup>	
Avant l'incubation	75,3	80	56,4	71,1 37,5 29,5
Après 24 h		84,4	73,2	71,1 48,6 25,6
Après 48 h		78,7	75,6	75 65 30,9
Après 3 jours		72,9	88,1	78,6 51,2 30,7
Après 4 jours		77,7	90	92 36,8 5,4
Après 5 jours		80	33,3	61 34 8

Tableau III. Nombre (en %) des embryons malformés

Date du traitement	Con-	Piqûre	Injection d'eau distillée	
	trôle		0,05 cm <sup>3</sup> 0,1 cm <sup>3</sup> 0,5 cm <sup>3</sup> 1 cm <sup>3</sup>	
Avant l'incubation	4,7	4,4	7,7	4,4 15 4,5
Après 24 h		2,2	2,4	4,4 18,5 18,9
Après 48 h		4,3	7,3	2,3 7,5 7,1
Après 3 jours		6,2	2,4	2,4 7,3 5,1
Après 4 jours		2,5	2	4 — 2,7
Après 5 jours		7,5	4,4	2,4 4 4

importants et, dans bien des cas, le pourcentage est superposable, même inférieur, à ce qu'on observe chez des œufs de contrôle n'ayant subi aucun traitement. Seules les grandes quantités d'eau distillée (les deux dernières colonnes) provoquent, surtout lorsque l'injection est faite au début de l'incubation, un % de malformés double ou triple par rapport au contrôle. En définitive, le Tableau montre d'une manière évidente que l'eau distillée n'est pas un agent tératogène: d'une part parce que le nombre des embryons malformés est toujours très petit, d'autre part, parce que le type des malformations ne se répète pas constamment; en effet, nous avons obtenu presque la gamme complète des malformations décrites par les différents auteurs chez l'embryon de poulet, sans aucune prédominance d'un type par rapport à un autre. Dans nos expériences, les embryons malformés sont morts presque toujours au cours de l'incubation et ne sont pas arrivés à éclore spontanément. Sur 71 malformés, il y a toutefois les 20% qui sont arrivés au 21<sup>e</sup> jour mais sans pouvoir éclore: il s'agit donc d'une mortalité très tardive. Une autre période durant laquelle nombre d'embryons malformés meurent se situe entre le 7<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour (durant cette période, les 57,1% des malformés sont morts). On peut donc affirmer que la plupart des embryons malformés meurent entre le 7<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour. Si les malformés dépassent cette période qui pour eux est cruciale, ils ont bien des chances d'arriver jusqu'au terme de l'incubation sans toutefois parvenir à l'éclosion.

*Conclusions.* De l'ensemble de ces recherches, nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

(a) La simple piqûre de l'œuf, faite dans le blanc, à divers stades d'incubation, est une stimulation mécanique très petite qui n'arrive pas à influencer ou à troubler le développement normal de l'embryon de poulet. En effet, chez les œufs piqués, le nombre des embryons qui meurent dans les premiers jours qui suivent la piqûre, le nombre des embryons qui arrivent au terme de l'incubation et le nombre des embryons malformés correspondent d'une manière presque identique à ce qu'on observe chez les œufs de contrôle qui n'ont subi aucun traitement.

En définitive, lorsque l'on injecte par piqûre dans l'œuf de poule une substance déterminée, nous pouvons retenir comme nul l'effet traumatique de la piqûre; par conséquent, les effets obtenus doivent être attribués uniquement à l'action de la substance introduite.

(b) L'eau distillée, introduite dans le blanc de l'œuf à des stades différents de l'incubation, peut avoir sur l'embryon une double action: léthale et tératogène. L'action léthale se rend évidente soit par la mort précoce des embryons soit par une mort plus tardive qui frappe les embryons au cours de l'incubation et qui ne leur permet pas d'arriver à l'éclosion. Toutefois, cette action léthale se manifeste à un degré très différent selon que la quantité d'eau distillée introduite est petite ( $1/20$  ou  $1/10$  cm<sup>3</sup>) ou

grande ( $1/2$  ou 1 cm<sup>3</sup>); dans le premier cas, l'action léthale précoce est évidente quoique toujours très modeste, tandis que l'action léthale tardive est presque inappréciable. Si la quantité d'eau distillée introduite est grande ( $1/2$  ou 1 cm<sup>3</sup>), l'action léthale précoce est importante et le nombre des embryons qui meurent au cours des trois premiers jours qui suivent l'injection varie de 13,5 à 78% des œufs injectés; de même, le nombre des embryons qui meurent plus tardivement (4<sup>e</sup>-20<sup>e</sup> jour) est toujours élevé et, dans certaines expériences, seulement les 8% des embryons sont encore vivants le 21<sup>e</sup> jour.

(c) L'action tératogène de l'eau distillée a été évaluée en se basant sur le nombre des embryons malformés qu'on a obtenus. Il faut dire avant tout que l'eau distillée n'est pas un agent tératogène, et qu'en aucun cas, elle ne manifeste d'action élective. Les petites doses ont un effet tératogène nul, les doses plus grandes ont un effet tératogène très modeste.

(d) Si l'on compare les chiffres des 3 Tableaux, il ressort que les grandes quantités d'eau distillée ont une action léthale, précoce et tardive, importante et également que l'effet tératogène est appréciable. Puisque ces mêmes actions sont presque nulles, aux doses très petites, il ressort d'une manière évidente que les faits constatés ne sont pas liés aux propriétés chimiques de l'eau, mais vraisemblablement à l'action de la masse de liquide injecté.

(e) Une conclusion d'ordre pratique qui peut être déduite de nos recherches est la suivante: si l'on doit essayer l'action d'une substance déterminée sur l'embryon de poulet et que cette substance doit être dissoute dans l'eau distillée, l'on doit dissoudre la substance dans des petites quantités d'eau ( $1/20$  ou  $1/10$  cm<sup>3</sup>). Dans ces conditions en effet, l'action mécanique de la piqûre et l'effet tératogène de l'eau sont nuls; l'action léthale de l'eau distillée reste dans des limites très modestes et, par conséquent, les effets observés sont uniquement la conséquence de l'action déployée par la substance employée.

*Summary.* The authors have tested the action of injection of distilled water ( $1/20$ ,  $1/10$ ,  $1/2$  and 1 cm<sup>3</sup>) on the development of the chick embryo. These injections were made at different moments of incubation. The two largest doses cause marked early mortality of embryos; when the doses are smaller, the lethal action is very slight. Distilled water has no teratogenic action: teratogenic action for the smallest doses is nil, and very little for the largest doses. The puncture alone of the egg has neither lethal nor teratogenic action.

G. CONTI et G. MILIO

*Institut d'Histologie et d'Embryologie générale de l'Université de Fribourg (Suisse), le 25 octobre 1963.*

## CONGRESSUS

### Italy

#### European Society for Biochemical Pharmacology

First International Symposium on Radiosensitizers and Radioprotective Drugs

Milano, May 23-24, 1964

*Main topics:* Immediate and long-distance effects of ionizing radiations. Drugs interfering with radiation effects. Clinical investigations with radiosensitizers and radioprotective drugs.

*President:* E. TRABUCCHI. *Correspondence to:* Prof. Dr. R. PAOLETTI, Institute of Pharmacology, University of Milano (Italy), Via A. del Sarto 21.