

mitotic indexes yielded values 0.4–0.8% (Table I). The values for the mitotic indexes of animals sacrificed 6 weeks after painting are higher than those for mice sacrificed 4 weeks after painting but the difference is not significant. The distribution of mitotic phases calculated on 126 mitotic figures showed 17% prophas, 30% metaphases, 18% anaphases and 35% telophases. Table II presents the frequency of mitoses 2 and 5 h after injection of colchicine. Between the 2nd and 5th h after injection, the mitotic index increased from 0.9–2.2%. To find the rate on an hourly basis, the difference between the values of the 2 and 5 h periods was divided by 3. Thus, 0.4% of mast cells in precancerous mouse skin may be roughly estimated to enter mitosis every hour.

The mitotic figures of mast cells can mainly be seen beneath the epithelium, although they may be also observed in deeper skin layers.

The results of the present study suggest that mitotic division is the prevailing way in which mast cells increase their number in precancerous mouse skin.

**Résumé.** En utilisant le 7,12-diméthylbenza( $\alpha$ )nitracène (DMBA) on a provoqué un papillome dans la peau de la souris. On observe de nombreuses figures mitotiques dans les mastocytes du papillome formé. Le coefficient mitotique est de 0,6–0,7%; l'injection de colchicine augmente sa valeur.

W. SAWICKI

Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Warsaw (Poland), 12th December 1966.

### L'induction neurogène chez les Oiseaux: passage du flux inducteur par le filtre millipore<sup>1</sup>

Des expériences nombreuses et variées ont démontré que chez les Amphibiens l'induction de l'ébauche neurale peut avoir lieu même si l'inducteur n'est pas en contact direct avec l'ectoblaste. Chez les Oiseaux, au contraire, nous ne disposons d'aucune précision à ce sujet. Pour combler cette lacune, nous avons entrepris des expériences analogues à celles que SAXÉN<sup>2</sup> avait effectuées chez le Triton, il y a quelques années. Cet auteur a interposé un filtre millipore (diamètre des pores – 0,8  $\mu$ , épaisseur du filtre – 20  $\mu$ ) entre le jeune ectoblaste et l'inducteur, soit normal soit artificiel (cellules HeLa). Malgré cette intervention, il a obtenu ou bien la formation d'une ébauche neurale typique, ou bien des inductions plus faibles, d'aspect neuroïdal, ou, enfin, l'ectoblaste, situé au-dessus du millipore, n'était que légèrement épaisse et composé de cellules cylindriques. Un peu plus tard, NYHOLM, SAXÉN, TOIVONEN et VANIO<sup>3</sup> ont repris ces expériences pour soumettre leurs préparations à l'analyse au microscope électronique. Il s'est révélé que le filtre millipore empêche effectivement tout contact direct entre les cellules de l'ectoblaste et l'inducteur.

Nos expériences sont faites sur de jeunes blastodermes de Poulet cultivés *in vitro* selon la technique de NEW<sup>4</sup> légèrement modifiée (voir GALLERA et CASTRO-CORREIA<sup>5</sup>).

Deux blastodermes servent à une seule opération: le donneur, toujours au stade de la ligne primitive achevée, et l'hôte, à un stade plus jeune (ligne primitive moyenne à longue). Les opérations sont pratiquées du côté ventral. Nous enlevons soigneusement l'endoblaste du croissant antérieur de Duval et le rempart vitellin situé plus en avant. Contre cet ectoblaste dénudé, nous appliquons un carré de millipore, dont le côté mesure 1,7 mm (Millipore filter Comp. Bedford, Massachusetts; épaisseur 25  $\mu$ , diamètre des pores 0,45  $\mu$ ). Nous découpons le tiers antérieur de la ligne primitive du blastoderme-donneur et nous le transportons sur ce fragment de millipore. Nous orientons le greffon de telle façon que sa face ventrale soit appliquée contre le filtre et son bord antérieur tourné vers l'extrémité céphalique de la ligne primitive de l'hôte. Le liquide surnageant soigneusement retiré, nous remettons le blastoderme à l'étuve. Le greffon se contracte tout d'abord et ne commence à adhérer au millipore

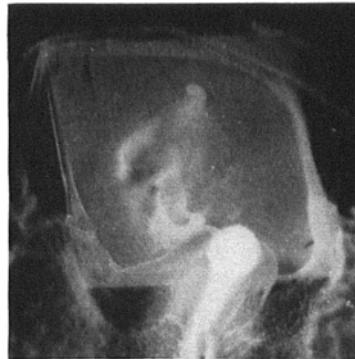


Fig. 1. Microphotographie in toto d'un blastoderme où le greffon mis sous le millipore a induit dans l'ectoblaste, situé de l'autre côté du filtre, la formation d'une plaque neurale. La tête de l'embryon-hôte surplombe partiellement le millipore.

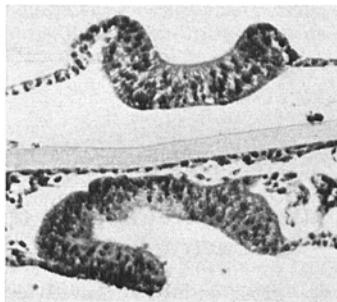


Fig. 2. Coupe d'un autre embryon que celui représenté sur la Figure 1. Sous le millipore, on voit l'ébauche neurale fournie par le greffon et au-dessus du filtre la plaque neurale induite.

<sup>1</sup> Travail subventionné par le Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

<sup>2</sup> L. SAXÉN, Devl Biol. 3, 140 (1961).

<sup>3</sup> M. NYHOLM, L. SAXÉN, S. TOIVONEN et T. VANIO, Expl Cell. Res. 28, 208 (1962).

<sup>4</sup> D. T. A. NEW, J. Embryol. exp. Morph. 3, 326 (1955).

<sup>5</sup> J. GALLERA et J. CASTRO-CORREIA, C. r. Séanc. Soc. Biol. 154, 2014 (1960).

qu'après un laps de temps variable. Pour faciliter cette adhésion, nous éliminons à maintes reprises le liquide sécrété par le feuillet interne du blastoderme. Le lendemain de l'opération les blastodermes sont fixés au Bouin, analysés *in toto* et ensuite inclus en paraffine et débités en coupes séries de 8  $\mu$  (Coloration à l'hémalun-érythrosine).

40 expériences ont été faites. Cependant, quelques blastodermes sont morts précocement et dans quelques autres cas, le greffon s'est détaché du millipore. En définitive, notre matériel contient 33 blastodermes.

L'examen histologique a révélé que l'elongation et la différenciation de nos greffons ont été plus ou moins inhibées. Ces greffons n'ont jamais dépassé les limites du millipore et se terminent par une masse cellulaire compacte. Plus en avant, ils se sont pourtant différenciés normalement et ont fourni une chorde, des somites, du mésenchyme et une gouttière neurale. Les greffons sont fortement attachés au millipore, en particulier de nombreuses cellules mésenchymateuses adhèrent à lui étroitement. En revanche, l'ectoblaste, revêtant la face opposée du filtre, est toujours séparé du millipore par un interstice qui semble vide au microscope optique. Cependant, à l'exception d'un seul cas, cet ectoblaste a toujours réagi à la présence du greffon situé de l'autre côté du millipore. Cette réaction, toujours localisée au territoire correspondant à l'emplacement du greffon, est en général la plus marquée à la hauteur de sa région antérieure. Dans 9 cas, il s'agit de la formation d'une petite, mais typique plaque neurale aux bords plus ou moins soulevés (Figures 1 et 2). Dans 7 cas, nous avons affaire à une différenciation plutôt neuroïdale que neurale. L'ectoblaste est épaisse en plaque, mais ses cellules sont moins allongées et moins régulièrement disposées que dans l'ébauche neurale normale du même âge. Dans les autres cas, l'ectoblaste situé vis-à-vis du greffon est moins épaisse et se présente soit sous la forme d'un épithélium aux cellules cylindriques dont les noyaux sont disposées en 2 ou 3 rangées (11 cas), soit d'un épithélium cubique, identique à l'épiblaste céphalique d'un jeune embryon (5 cas).

Insistons encore sur le fait qu'à part la zone correspondant à l'emplacement du greffon, l'ectoblaste sur toute l'étendue du millipore est composé de cellules fortement

aplaties et garde son caractère périphérique. Il est donc évident que l'action inductrice du greffon sur l'ectoblaste a dû se réaliser à travers le filtre millipore. Quoique l'analyse au microscope optique ne nous permette pas d'affirmer d'une façon définitive que cette réaction ne s'exerce pas par l'intermédiaire de microvillosités transversant le millipore, cette éventualité nous paraît peu probable. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, l'ectoblaste n'adhère jamais au millipore. D'autre part, aussi bien chez les Amphibiens que chez les Mammifères (voir GROBSTEIN et DALTON<sup>6</sup>), le millipore, même aux pores plus larges que dans le nôtre, intercalé entre les systèmes inducteur et réagissant n'a pas été traversé par de tels prolongements plasmatiques. Enfin, BELLAIRS<sup>7</sup>, en soumettant de jeunes embryons de Poulet à l'analyse détaillée au microscope électronique, n'a jamais observé des microvillosités reliant le neurectoblaste à son substratum chorde mésoblastique.

Pour clore cette note préliminaire, soulignons l'analogie frappante entre nos résultats et ceux obtenus par SAXÉN chez les Amphibiens. Aussi bien chez le Poulet que chez le Triton, l'action inductrice peut s'exercer à travers un filtre millipore, bien que ce dernier représente un obstacle sérieux. Dans les deux cas, les réponses de l'ectoblaste au flux inducteur plus ou moins freiné par le millipore s'ordonnent comme suit: épiblaste épaisse, structures neuroïdales et, enfin, neurales typiques.

**Summary.** In the avian embryo, as in the amphibian, we can even obtain a neural induction, if we interpose a millipore filter (thickness 25  $\mu$ , size of pores 0.45  $\mu$ ) between the inductor and the competent ectoblast.

J. GALLERA

*Laboratoire d'Embryologie expérimentale, Institut d'Anatomie de l'Université de Genève (Suisse),  
30 décembre 1966.*

<sup>6</sup> C. GROBSTEIN et A. J. DALTON, *J. exp. Zool.* 135, 57 (1957).

<sup>7</sup> R. BELLAIRS, *J. Embryol. exp. Morph.* 7, 94 (1959).

## Electron Microscopical Aspects of Myelin Ultrastructure

At present, the most widely accepted view on myelin structure is the one that each lamella is the result of the apposition of 2 'unit membranes'<sup>1</sup>. However, the unit membrane theory does not provide a convincing explanation for at least 2 well-established facts: the greater thickness of the major dense line in comparison with the intraperiod line and the existence of double intraperiod lines.

Moreover, as reported elsewhere<sup>2</sup>, the results of high-resolution electron microscopical observations on thin sections of glutaraldehyde-fixed, post-osmicated, Epon-embedded tissues suggested a structural organization of biological membranes more complex than the one described by the 'unit membrane' concept. Indeed, in

preparations of frog brain cortex, the membrane of synaptic vesicles appeared to consist essentially of a single layer of globules (diameter about 40–45 Å) having a thin electron-dense contour and a light core and bound to each other directly or through an osmiophilic granule. In face-on views, the membrane appeared to be a mesh of polygonal or round areas (diameter 90–110 Å) of unstained material limited by osmiophilic lines, containing in their centers an osmiophilic granule (diameter 20–30 Å). In these unstained areas it was often possible to

<sup>1</sup> J. D. ROBERTSON, in *Ultrastructure and Metabolism of the Nervous System* (Ed. S. R. KOREY, A. POPE and E. ROBINS; Williams and Wilkins, Baltimore 1962), p. 94.

<sup>2</sup> V. DI CARLO, *Nature* 213, 833 (1967).