

Table I. Water, hydroxyproline, hexosamine, uronic acid and excess hexosamine in control and DMBA painted mouse skin

Group	Water, % of wet weight	Water, % of dried and defatted weight	Hydroxyproline	Hexosamine	Uronic acid Carbazole	Orcinol	Excess hexosamine
Control (8)	57.9 ± 2.9	237 ± 14	23.9 ± 2.0	3.40 ± 0.21	0.97 ± 0.04	1.03 ± 0.07	2.45 ± 0.15
Benzene (8)	54.7 ± 2.2	233 ± 12	23.7 ± 1.4	3.70 ± 0.24	0.99 ± 0.03	1.11 ± 0.02	2.67 ± 0.23
Carcinogen 4 weeks (7)	68.5 ± 1.9 <sup>b</sup>	368 ± 19 <sup>c</sup>	27.2 ± 1.8	5.60 ± 0.14 <sup>c</sup>	1.23 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.15 ± 0.07	4.54 ± 0.14 <sup>c</sup>
Carcinogen 8 weeks (8)	68.9 ± 1.1 <sup>b</sup>	304 ± 7 <sup>c</sup>	31.8 ± 2.2 <sup>a</sup>	4.50 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.97 ± 0.04	1.12 ± 0.06	3.47 ± 0.15 <sup>c</sup>
Carcinogen 12 weeks (7)	68.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	295 ± 8 <sup>b</sup>	24.3 ± 1.6	4.30 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.07	1.25 ± 0.05	3.15 ± 0.24 <sup>a</sup>

Figures in brackets indicate the number of mice. Values in g/mg dried, defatted tissue, in the last 6 columns. Mean values and standard error of mean are indicated. Significantly different from controls at the 5%<sup>a</sup>, 1%<sup>b</sup> and 0.1%<sup>c</sup> level of probability.

Table II. Hexosamine to hydroxyproline, uronic acid to hydroxyproline, and carbazole to orcinol ratios in control and in DMBA painted mouse skin

Group	Hexosamine	Uronic acid	Carbazole
	Hydroxyproline	(orcinol) Hydroxyproline	Orcinol
Control (8)	0.144 ± 0.008	0.045 ± 0.002	0.95 ± 0.03
Benzene (8)	0.160 ± 0.009	0.048 ± 0.001	0.89 ± 0.04
Carcinogen 4 weeks (7)	0.212 ± 0.017 <sup>b</sup>	0.040 ± 0.003	1.09 ± 0.07
Carcinogen 8 weeks (8)	0.144 ± 0.009	0.036 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.05
Carcinogen 12 weeks (7)	0.181 ± 0.012 <sup>a</sup>	0.051 ± 0.004	0.67 ± 0.03 <sup>c</sup>

Figures in brackets indicate the number of mice. Figures include mean values and standard error of mean. Significantly different from control values at the 5%<sup>a</sup>, 1%<sup>b</sup> and 0.1%<sup>c</sup> level of probability.

uronic acid, indicates an increase in neutral mucopolysaccharides.

The increase in acid mucopolysaccharides found in this study probably originates from the accumulation of dermal mast cells<sup>14</sup>.

The different ratios (Tables I and II) suggested qualitative changes in the composition of the connective-tissue ground substance of mouse skin<sup>4,15</sup>. These observations are supported by the electrophoretic results.

**Zusammenfassung.** Biochemische Analysen von Mäusehaut, die mit der karzinogenen Substanz DMBA bepinselt worden war, zeigten Veränderungen im Gehalt an Wasser, Hydroxyprolin, Hexosamin und Uronsäure.

M. B. KETKAR

University of Copenhagen, Department of Dermatology with Connective Tissue Research Laboratories, Rigshospitalet, Copenhagen (Denmark), 15 November 1967.

<sup>14</sup> G. I. HORSFIELD and R. SUMMERLY, Br. J. Derm. 78, 476 (1966).

<sup>15</sup> K. MEYER, P. HOFFMANN and A. LINKER, in *Connective Tissue Symposium* (Blackwell, Oxford 1957).

## Electrophorèse des hémoglobines de poulet sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide lorsqu'elle est pratiquée selon la technique de DAVIS<sup>1</sup>, sépare les hémoglobines de l'embryon de 5 jours et de la poule adulte en 2 constituants dont l'un paraît commun aux 2 hémolysats (Figure A). Or, l'électrophorèse sur gel d'amidon<sup>2-4</sup> et la chromatographie sur CM-cellulose<sup>5</sup> paraissent indiquer d'une part qu'il existe au moins 3 constituants hémoglobiniques chez l'embryon de 5 jours et 5 chez l'adulte, d'autre part que les hémoglobines des embryons les plus jeunes sont totalement différentes de celles de l'adulte. Il apparaît donc que les conditions d'électrophorèse décrites par DAVIS<sup>1</sup> ne sont pas celles qui donnent pour les hémoglobines de poulet le maximum de séparation possible.

Cette situation nous a conduits à modifier divers aspects de la technique de DAVIS et à appliquer la méthode obtenue à l'étude de l'évolution des hémoglobines au cours du développement du poulet.

**Méthodes.** (1) Les animaux et les embryons utilisés sont de race Leghorn. Les hémolysats sont préparés à 4°C par lyse des erythrocytes fraîchement collectés. Ils sont employés le jour même car la conservation fait apparaître des constituants supplémentaires de nature artefactuelle. Les hémolysats sont dans certains cas débarrassés des protéines non hémoglobiniques par filtration sur colonne de Sephadex G75 avant d'être soumis à l'électrophorèse.

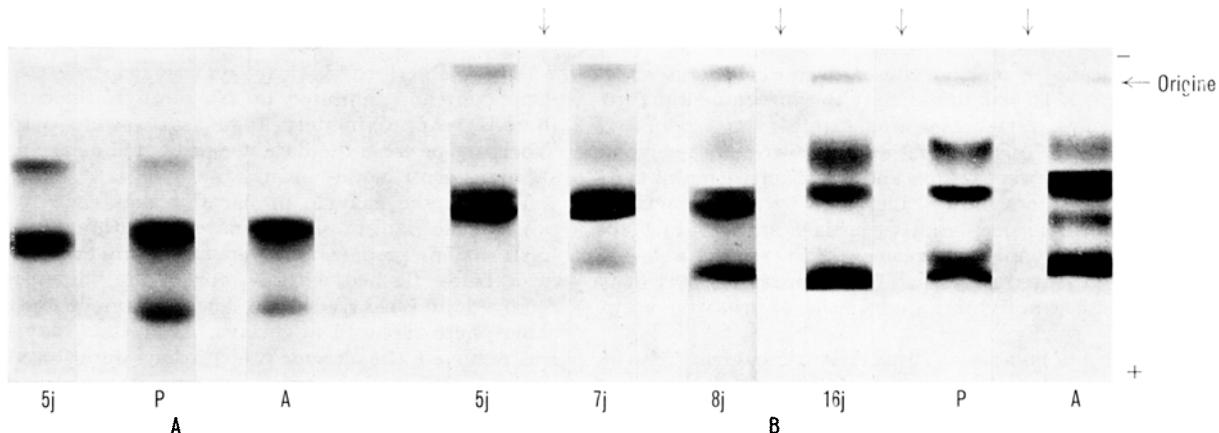
(2) Chaque tube de polyacrylamide est constitué de 0,25 ml de gel espaceur et de 1 ml de gel d'électrophorèse préparés de la façon présentée dans le Tableau.

<sup>1</sup> B. J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 305 (1964).

<sup>2</sup> C. MANWELL, C. M. A. BAKER et T. W. BETZ, J. Embryol. exp. Morph. 16, 65 (1966).

<sup>3</sup> J. GODET, C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 264, 2570 (1967).

<sup>4</sup> J. GODET, C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 265, 1401 (1967).



(A) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en employant la technique de DAVIS (1964). (B) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide selon notre technique. 5 j, 7 j, 8 j, 16 j = hémolysats obtenus à partir d'embryons incubés depuis 5, 7, 8 et 16 jours. P, hémolysat fourni par un poussin d'un jour. A, hémolysat fourni par un coq âgé de 2 ans. Les flèches indiquent les phases de changement dans la constitution des hémolysats.

Les hémolysats sont placés directement à la surface du gel espaceur, sans sucre ni gel échantillon.

(3) Les réservoirs du dispositif d'électrophorèse sont remplis d'une solution de *Tris* 0,01 M ajustée à pH 8,0 par de l'acide borique cristallisé. Les tubes de polyacrylamide sont soumis pendant 45 min à un courant d'intensité constante de 3 mA par tube.

(4) Les gels sont photographiés, sans coloration préalable, immédiatement après la fin de l'électrophorèse.

*Résultats et discussion.* (1) Comme l'indiquent les figures A et B, les conditions d'électrophorèse employées permettent de séparer les hémolysats, obtenus à partir d'embryons ou d'animaux d'âges variés, en constituants dont le nombre est toujours supérieur à celui que fournit la technique de DAVIS. Ce nombre n'est pas modifié par la purification préalable des hémolysats sur colonne de Sephadex.

(2) L'hémolysat de l'embryon de 5 jours est divisé en 4 bandes; celui de l'adulte se répartit en 5 constituants

dont 2 au moins n'existent pas chez l'embryon de 5 jours. Entre le 4<sup>e</sup> jour de l'incubation et les premiers jours qui suivent l'élosion, le nombre des bandes visibles est de 4 ou 5 selon l'âge considéré. Il faut noter de plus l'existence, pendant cette période, d'au moins un constituant qui du fait de sa migration fortement cathodique ne pénètre pas dans le gel de polyacrylamide et s'échappe dans le tampon du réservoir supérieur.

(3) Il y a lieu de rester prudent quant à l'interprétation des bandes séparées par électrophorèse. Une partie d'entre elles peut révéler des artefacts de traitement et l'ensemble est actuellement soumis à l'examen par d'autres moyens. Quelle que soit l'interprétation donnée aux divers éléments dont la présence est révélée, il faut constater que les observations présentent un caractère parfaitement reproduisible pour les animaux d'un âge donné. Le diagramme en lui-même est donc caractéristique de cet âge.

(4) Quelle que soit la valeur accordée à chacune des bandes isolément, toute modification du diagramme de séparation révèle l'existence d'un changement, dont la nature exacte reste à analyser, dans la constitution des hémoglobines. En se fondant sur ce raisonnement, on peut distinguer au cours du développement du poulet au moins 4 périodes de changement qui sont marquées par des flèches sur la Figure B. Ces résultats confirment les observations faites à la suite d'électrophorèse sur gel d'amidon<sup>4</sup>.

#### Composition des gels de polyacrylamide

Gel espaceur	Gel d'électrophorèse
1 volume d'une solution de 1N HCl      48 ml <i>Tris</i> 5,98 g TEMED      0,46 ml eau qs      100 ml (pH 6,7)	1 volume d'une solution de 1N HCl      48 ml <i>Tris</i> 36,6 g TEMED      0,23 ml eau qs      100 ml (pH 8,9)
2 volumes d'une solution de acrylamide    28,0 g BIS           0,735 g eau qs        100 ml	2 volumes d'une solution de acrylamide    28,0 g BIS           0,735 g eau qs        100 ml
1 volume d'une solution de riboflavine   4 mg eau           100 ml	1 volume d'eau distillée
4 volumes d'une solution de sucrose       40 g eau           100 ml	4 volumes d'une solution de persulfate     0,14 g d'ammonium eau            100 ml

*Summary.* An electrophoretic method derived from DAVIS' technique on polyacrylamide gel was set up to study the separation of hemoglobins. This method shows that during chicken development hemoglobins undergo 4 periods of change. This confirms our earlier results obtained with other methods.

D. SCHURCH, J. GODET,  
V. NIGON et J. P. BLANCHET

Section de Biologie générale et appliquée, Laboratoire associé au C.N.R.S., Faculté des Sciences de Lyon (France), 18 décembre 1967.

<sup>4</sup> K. HASHIMOTO et F. H. WILT, Proc. natn. Acad. Sci. 56, 1477 (1966).