

of I, the guinea-pigs show neither a leucopenia nor a weight loss and they all survive. Lower doses of THFA do not completely prevent but only reduce bone marrow depression, weight loss and lethality. A reduction of the leucopenia is still achieved, but to a lesser extent, when THFA is injected only 8 h after the administration of I. If instead of THFA the ordinary folic acid is used in doses of up to 30 mg/kg daily, the effect of I was not antagonized at all.

In experiments in vitro and in vivo the inhibition of dihydrofolate reductase activity was demonstrated by BURKARD⁶. The dihydrofolate reductase activity of guinea-pig liver is markedly inhibited. This corresponds to the sensitivity of the guinea-pig's hematopoiesis to I. On the other hand the dihydrofolate reductase activity of rat liver is not inhibited, which parallels the fact that the rat's hematopoiesis is not sensitive to I.

It is known⁷ that the antimalarial biguanides are metabolized to the corresponding 4,6-diamino-1,2-dihydro-s-triazines, which are considered to be the active metabolites against plasmodia. It was first thought that those species sensitive to I would metabolize I to the corresponding diaminodihydrotriazine which is known to be a folic acid antagonist and to possess some antitumour properties⁸, whereas the other species resistant to I would not metabolize I in this way.

In studying the metabolism of I in different species ESCHENHOF⁹ was able to show that there is no parallelism between the metabolism of I to 1-(3,4-dichlorophenyl)-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-s-triazine and the leucopenia or antitumour effect. Thus it may be supposed that the species dependence of this folic acid antagonist is due not to a different metabolism but to a varying sensitivity of the different dihydrofolate reductases to I.

Boron compounds. In order to obtain a more selective cytotoxic effect SPIEGELBERG and RAMUZ¹⁰ synthesized a series of boron compounds of I, as SOLOWAY¹¹ had demonstrated a certain affinity of boric acid and related compounds to tumours. The majority of these compounds showed, if given orally or i.p., a similar species dependent effect on the hematopoiesis. The boric acid derivative, 4 (or 2)-[4-(3,4-Dichloroanilino)-6-(isopropylamino)-1,3,5,

2-triazaborin-2(5 H)-yl]-1-(3,4-dichlorophenyl)-5-isopropylbignamide, for example, induces a leucopenia similar to that of I and this effect is also antagonized by THFA.

Zusammenfassung. 1-(3,4-Dichlorphenyl)-5-isopropylbiguanid (I) besitzt cytostatische Eigenschaften, die spezieabhängig sind. I übt eine stark depressive Wirkung auf die Hämatopoese von Meerschweinchen, Katze und Mensch aus, während das Knochenmark von Maus, Ratte, Kaninchen und Hund nicht beeinflusst wird. Transplantable Tumoren von Maus und Ratte werden in ihrem Wachstum nicht gehemmt. Hingegen liessen sich beim Menschen objektive Regressionen einiger Tumorarten beobachten. Die Wirkung auf die Meerschweinchenleukopenie kann durch Formyltetrahydrofolsäure aufgehoben werden. I hemmt die Dihydrofolatreduktase der auf I empfindlichen Spezies Meerschweinchen, nicht aber das entsprechende Ferment der auf I resistenten Spezies Ratte. Der Folsäureantagonismus ist spezieabhängig, was auf eine verschiedene Empfindlichkeit der Dihydrofolatreduktasen und nicht auf einen verschiedenen Metabolismus zurückzuführen sein dürfte. Borverbindungen von I besitzen ähnliche cytostatische Eigenschaften.

W. BOLLAG

Mediz. Forschungsabteilung,
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG
and Mediz. Universitätsklinik, Basel (Switzerland),
16 July 1968.

⁶ W. BURKARD, in preparation.

⁷ H. C. CARRINGTON, A. F. CROWTHER, D. G. DAVEY, A. A. LEVI and F. L. ROSE, *Nature* 168, 1080 (1951).

⁸ S. FARBER, I. DIAMOND, G. FOLEY and E. J. MODEST, *Am. J. Path.* 28, 559 (1952).

⁹ E. ESCHENHOF, unpublished results.

¹⁰ H. SPIEGELBERG and H. RAMUZ, personal communication.

¹¹ A. H. SOLOWAY, in *Progress in Boron Chemistry* (Ed. H. STERNBERG and A. L. McCLOSKEY; Pergamon Press, Oxford 1964), vol. 1, p. 203.

Sur le comportement d'artères «temporaires» de l'embryon de poulet explantées in vitro¹

Dans des notes précédentes publiées dans cette revue²⁻⁴, nous avons communiqué les résultats d'expériences portant sur un certain nombre d'artères d'embryon de poulet cultivées in vitro selon la méthode de WOLFF. On a étudié le comportement d'artères élastiques, d'artères musculaires et aussi d'une artère – l'aorte – présentant une structure élastique dans sa partie crâniale et une morphologie musculaire dans son segment caudal. Les données fournies par les cultures de l'aorte nous ont confirmé ce qu'on avait déjà observé auparavant sur les artères élastiques et musculaires, étudiées séparément.

Il nous a paru intéressant de considérer encore certaines artères «temporaires», dont la durée de vie est limitée à la période embryonnaire du poulet et qui vont disparaître au moment de l'éclosion: les artères du sac vitellin et de la membrane chorio-allantoïdienne. Les premières sont les véritables «canaux nourriciers» destinés à prendre la nourriture du jaune et à la véhiculer, par l'intermédiaire des veines, vers l'embryon. Les secondes, logées dans la membrane homonyme, réalisent par l'intermédiaire de la coquille les échanges gazeux entre l'embryon et l'extérieur.

On a étudié la genèse de ces vaisseaux temporaires sur des embryons du 5e au 20e jour. La morphologie au cours du développement est à peu près superposable dans les 2 sortes d'artères; la description que nous en donnons est donc valable, à quelques différences près, pour les vaisseaux vitellins et chorioallantoïdiens. Au 5e jour, les artères sont formées par une lame endothéliale autour de laquelle se disposent quelques couches mésenchymatiques. Ces dernières se différencient déjà au 6e jour et la morphologie des cellules rappelle les myoblastes. On distingue facilement à cet âge les artères des veines; autour des premières, les cellules mésenchymatiques sont plus abondantes et en phase plus avancée de différenciation. Cette

¹ Ces recherches ont bénéficié d'un subside du Fonds National Suisse de la Recherche scientifique et de la Fondation E. Barell de la Maison Hoffmann-La Roche SA, Bâle.

² G. CONTI, B. CAPPELLI et J. P. MUSY, *Experientia* 24, 591 (1968).

³ G. CONTI, B. CAPPELLI et J. P. MUSY, *Experientia* 24, 710 (1968).

⁴ G. CONTI et B. CAPPELLI, *Experientia* 24, 825 (1968).

différence entre artères et veines va s'accroître par la suite (7e-8e jour), et les myoblastes artériels prennent peu à peu l'aspect des cellules musculaires. Cette morphologie varie peu dans les jours qui suivent, seule la quantité des différents composants morphologiques augmente. La morphologie définitive de la paroi artérielle est acquise vers le 10e jour; à ce moment, toutefois, la musculature est plus abondante dans les artères chorio-allantoïdiennes que dans les artères vitellines. L'explication fonctionnelle la plus plausible de ce fait nous paraît la suivante: les vaisseaux vitellins sont situés relativement près du cœur, et à leur niveau l'impulsion cardiaque agit encore assez intensément; les vaisseaux chorio-allantoïdiens, situés beaucoup plus distalement, se trouvent dans des conditions exactement contraires. Une autre cause pouvant nous expliquer la richesse majeure en musculature des artères chorio-allantoïdiennes, pourrait être la suivante: les artères vitellines font directement suite à l'artère mésentérique, caractérisée par l'épaisseur notable de sa tunique musculaire formée par 2 couches concentriques, interne circulaire et externe longitudinale. L'activité contractile intense de la mésentérique favorise sans doute la progression du sang au niveau des vaisseaux vitellins. Les artères chorio-allantoïdiennes par contre font suite à l'aorte terminale qui, dans sa partie toute distale, comporte très peu d'éléments musculaires; d'où la nécessité que les artères chorio-allantoïdiennes possèdent dans leur paroi un dispositif musculaire de propulsion assez important.

Les éléments musculaires des vaisseaux temporaires se caractérisent par une morphologie particulière: même au 10e-11e jour, lorsque la paroi artérielle a atteint le maximum de son développement, ils ne présentent pas les caractères de véritables cellules musculaires, telles qu'on les voit habituellement dans les autres artères de l'embryon de poulet; un certain aspect épithélioïde persiste toujours. Déjà à partir du 13e jour, se manifestent des signes morphologiques qui témoignent de l'involution ultérieure de ces artères. Dans les jours qui suivent, les signes d'involution s'accroissent pour atteindre un degré élevé vers le 16e jour. A ce moment du développement, la tunique moyenne se divise en 2 couches: l'une plus interne, mince et adossée à la lame endothéliale, plus ou moins encore musculaire; l'autre plus externe, 3 fois plus épaisse, se différencie, les cellules musculaires reprennent entièrement l'aspect épithélioïde originel, et au sein de leur cytoplasme, on voit parfois apparaître quelques vacuoles lipidiques. Ce n'est qu'au cours du 18e-19e jour que les signes d'involution atteignent leur maximum. Un peu de musculature persiste ou peut persister encore, autour de l'endothélium, mais la presque totalité de la paroi est formée par du tissu collagène, au sein duquel les cellules sont pauvres, très fortement différenciées, leur cytoplasme présentant souvent un aspect pulvérulent. Parallèlement à ces phénomènes d'atrophie musculaire et de différenciation de la paroi artérielle, nous avons constaté dans la paroi des veines chorio-allantoïdiennes des phénomènes contraires. Ces veines qui, jusqu'à l'âge de 15 jours environ, sont formées par une simple lame endothéliale environnée d'un peu de tissu conjonctif, subissent des remaniements profonds et s'enrichissent en musculature; dans quelques cas même, la paroi veineuse paraît être plus musculeuse que la paroi artérielle. Ces transformations n'ont rien d'étonnant et montrent une fois de plus l'extrême malléabilité du système musculaire vasculaire qui s'adapte aux différentes conditions hémodynamiques: la musculature de la paroi artérielle va peu à peu disparaître, la destinée définitive du vaisseau est ainsi marquée; dans la paroi veineuse, un nouveau dispositif de propulsion s'organise pour faire face aux besoins accrus de la progression sanguine.

On a explanté, selon la technique habituelle, les artères vitellines et chorio-allantoïdiennes, prélevées sur des embryons d'âge différent, du 6e au 18e jour d'incubation. La période de culture s'étend de 24 h à 8 jours. Dans l'ensemble, la culture de ces vaisseaux ne nous a pas apporté de résultats intéressants. Les artères prélevées sur des embryons de 6 à 9 jours, ne révèlent aucune capacité de survie; seule la lame endothéliale persiste et parfois elle ne se présente pas en bon état de conservation. Les tissus périendothéliaux se différencient toujours, souvent ils présentent des signes marqués de dégénérescence lipidique, parfois même de nécrose. Les artères prélevées sur des embryons en âge plus avancé présentent dans l'ensemble le même comportement: la différenciation des cellules conjonctives est toujours marquée et les éléments musculaires prennent peu à peu un aspect mésenchymatique juvénile. Autour de la lame endothéliale, s'organise un tissu conjonctif plus ou moins dense au sein duquel toute trace d'éléments musculaires a entièrement disparu.

En résumé, on peut dire que les artères explantées présentent, très concentrés dans le temps, les mêmes phénomènes d'atrophie et d'involution que ceux observés dans un temps plus échelonné sur les artères de contrôle non cultivées.

Dans la lumière des artères vitellines, on a parfois enfilé 2 crins de Florence pour observer la réaction du vaisseau vis-à-vis de cette stimulation anormale. Malgré que l'aspect morphologique de la paroi ne soit pas amélioré par les crins, la présence de ceux-ci stimule les cellules endothéliales qui prolifèrent formant une lame se glissant entre un crin et l'autre et divisant très souvent la lumière en 2 compartiments séparés. Cette travée de division a une certaine consistance et solidité; lorsqu'on retire les crins pour l'inclusion microscopique, la travée de division n'est pas abîmée, elle persiste, elle se voit très bien ensuite sur les coupes microscopiques.

En définitive, les résultats de toutes nos expériences, actuelles et précédentes, peuvent être résumés de la manière suivante: les artères élastiques, dont l'épaisseur et la consistance sont les plus élevées, sont celles qui survivent mieux en culture et qui ne présentent jamais de phénomènes de dégénérescence et de nécrose. L'attitude à la survie in vitro des artères de type musculaire est moins importante; le degré de différenciation est toujours élevé, souvent les éléments musculaires disparaissent totalement. Les artères vitellines et chorio-allantoïdiennes, dont la durée de vie est limitée et qui sont nécessairement destinées à une involution précoce et à disparaître, révèlent in vitro, en dehors de leur milieu normal de vie, une capacité nulle de survie.

Le comportement tout particulier du matériel élastique de la paroi artérielle explantée in vitro mérite d'être souligné. Dans la totalité des vaisseaux étudiés, le seul composant morphologique de la paroi artérielle qui, sur notre milieu, poursuit sa croissance, est le matériel élastique. Les fibres élastiques augmentent en nombre et en épaisseur, et le plexus elasticus externus devient particulièrement abondant. Parfois, la netteté des fibres élastiques est moins évidente que dans les artères de contrôle non cultivées; ces fibres paraissent un peu floues, leurs contours sont évanescents. L'interprétation plus vraisemblable de ce phénomène réside, à notre avis, dans la constitution physico-chimique même du matériel élastique, pourvue sans doute d'un métabolisme très ralenti, ne nécessitant que des échanges peu importants avec le milieu de culture; le milieu de WOLFF est adéquat à la survie du matériel élastique.

Sur la base des résultats de toutes nos expériences sur la culture des vaisseaux, il est intéressant de remarquer

que tous les organes embryonnaires du poulet, cultivés in vitro jusqu'ici (milieu standard de WOLFF et HOFFEN⁵), sont capables de se développer et de croître jusqu'à un certain stade, à l'exception des vaisseaux sanguins qui, pourtant, ne sont pas les seuls organes dotés de muscles lisses. Nous pensons qu'à l'origine de cet état de choses, il y a surtout 2 facteurs qui entrent en jeu: un facteur mécanique et un facteur chimique. Dans les vaisseaux explantés, il manque en effet le stimulus mécanique qui, in vivo, est représenté par le flux du liquide traversant la lumière; ce facteur mécanique joue sans doute un rôle morphogénétique important pour la différenciation et l'accroissement des différents composants de la paroi artérielle. Si nous pouvions réaliser un dispositif de perfusion capable d'entretenir, pendant toute la période de culture, le passage d'un liquide dans la lumière du vaisseau, le rôle du facteur mécanique pourrait être précisé davantage. Nous avons déjà fait des essais préliminaires dans ce sens, mais le problème n'est pas facile à résoudre sur le plan technique, compte tenu surtout de la petitesse des vaisseaux explantés. Quant au deuxième facteur pouvant représenter une entrave à la survie des vaisseaux cultivés, il pourrait s'agir sans doute d'une question de milieu qui, tout en étant le milieu idéal pour les autres organes de l'embryon de poulet, ne serait pas le milieu de culture le plus adéquat pour assurer le métabolisme de la paroi vasculaire. Des recherches précédentes^{6,7} nous ont confirmé la validité de cette hypothèse. En ajoutant en effet

au milieu standard de WOLFF des doses variables de facteur *P*, nous avons constaté pour les artères soumises à ces expériences, (artères mésentérique et chorio-allantoïdienne) une meilleure survie hors de l'organisme: pas de signes de souffrance, la musculature persiste, souvent elle augmente en culture. Nous en avons alors conclu que le facteur *P* est essentiel au développement et au maintien des structures normales des vaisseaux cultivés in vitro.

Summary. The authors have studied the normal embryonal development of chick embryo's vitelline and chorioallantoic vessels and the behaviour of these vessels explanted in vitro. They resumed, afterwards, the results obtained from several series of vessels observed in the same normal and experimental conditions.

G. CONTI et B. CAPPELLI

Institut d'Histologie et d'Embryologie générale de l'Université de Fribourg (Suisse), le 29 mars 1968.

⁵ E. WOLFF et K. HOFFEN, Texas Rep. Biol. Med. 10, 463 (1952).

⁶ B. CAPPELLI, G. CONTI, L. LASZT et B. MANDI, Angiologica 5, 28 (1968).

⁷ B. CAPPELLI, G. CONTI, L. LASZT et B. MANDI, Angiologica 5, 41 (1968).

Age Dependence of Nuclear DNA Content of Rat Adipose Tissue Cells

Up to now it is an open question whether the enlargement of adipose tissue is due to an actual increase in cell number or simply to an additional storage of fat¹. To decide this question, biochemical DNA-determinations on adipose tissue have been accomplished by others²⁻⁴. From the total amount of DNA, estimated by these methods, the number of fat cells can be computed only if the DNA-content of the nuclei is constant and exactly known. Such DNA-determinations can only be made cytophotometrically.

The epididymal fat pads of male wistar A/F Han-Rats (Central Institute for Experimental Animal Breeding, Hannover) have been examined. Adipose tissue cells were isolated according to ROBBELL⁵. Smears were fixed in absolute alcohol and Feulgen stained in a modification given by SWIFT⁶. The Feulgen dye content was measured with an integrating microdensitometer⁷.

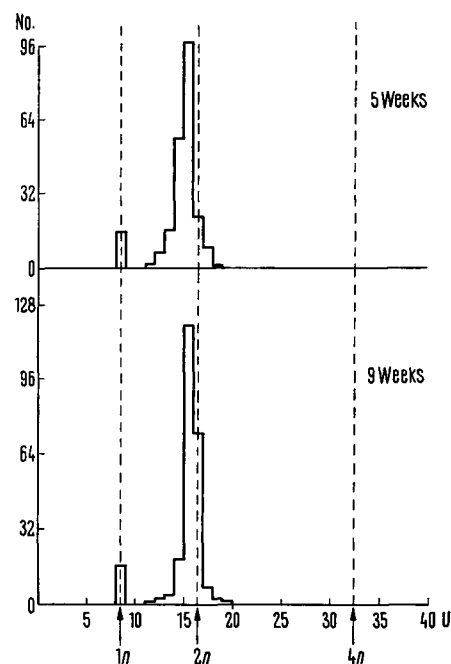


Fig. 1. Nuclear DNA-content of adipose tissue cells of rats aged 5 and 9 weeks. Abscissa: No. of measured nuclei; ordinate: DNA-content in arbitrary units (U). The first column represents DNA-content of rat-spermatozoa (reference value). $1n$, $2n$, $4n$ = haploid, diploid and tetraploid DNA-value.

¹ F. X. HAUSBERGER, in *Handbook of Physiology*, V. *Adipose Tissue* (Ed. A. E. RENHOLD and G. CAHILL JR., Williams and Wilkins Co., Baltimore 1965), p. 519.

² J. HIRSCH and R. B. GOLDRICK, J. clin. Invest. 43, 1776 (1964).

³ S. C. PECKHAM, C. ENTENMAN and H. W. CARROL, J. Nutr. 77, 187 (1962).

⁴ W. ZINGG, A. ANGEL and M. D. STEINBERG, Can. J. Biochem. 40, 437 (1962).

⁵ M. ROBBELL, J. biol. Chem. 239, 375 (1964).

⁶ H. SWIFT, in *The Nucleic Acids* (Academic Press, New York 1955), vol. 2, p. 51.

⁷ E. M. DEELEY, J. Scient. Instrum. 32, 263 (1955).