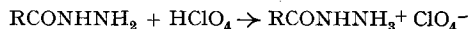


Results and discussion. The experimental error inherent in the determinations was 3%. This error arises from the deviations possible in the weighings of the sample and the droplet size.

The mol. wt. of a peptide hydrazide determined by perchloric acid titration was calculated from the following stoichiometry:



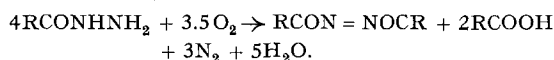
The titration using the perchloric acid in glacial acetic acid and methyl violet indicator had sharp end-points while the same acid in dioxane using thymol blue as indicator gave poor end-points. The former titrant gave results which on the average were within the experimental error (Table).

The stoichiometry for the titration of peptide hydrazides with NaOBr is¹²



The end-point with methyl red indicator is sharp and the deviation of the molecular weight found from the true mol. wt. is on the average 3.6% (Table).

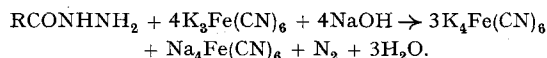
The oxidation of acid hydrazides by KMnO_4 involves a 3.5 electron change per hydrazide group⁹.



The titrant does not need an indicator and the mol. wt. determinations had the same accuracy as the sodium hypobromite determinations (Table).

Base titration of the peptide hydrazides with potassium *t*-butoxide¹⁷ (0.05 *N*) using any of the following indicators gave obscure end-points: *o*-nitroaniline, tropaeolin 00 or brilliant cresol blue. The best end-point was obtained with *o*-nitroaniline, the error being 10–15%.

The reaction of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ with acid hydrazides is⁸



When the peptide hydrazide is dissolved in DMF and excess NaOH is added, the direct titration with $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ produces no colour change at the equivalence point. However, if excess $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ is present in the above peptide solution, the excess NaOH may be titrated with the aid of phenolphthalein indicator (red to yellow) and the mol. wt. may be determined for the peptide hydrazide. Such determinations gave only 10–15% accuracy. 0.2 *N* $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 0.1 *N* NaOH using phenolphthalein as indicator was tested as a direct titrimetric method. In this case the colour change (yellow to red) occurs before the equi-

valence point but slowly reverts to the initial colour. The reappearance of the initial colour indicates that peptide hydrazides are slowly oxidized by $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Therefore this oxidant is a poor volumetric titrant for this class of compounds.

Similar difficulties were encountered with the oxidants $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ and chloramine-T.

Determinations of the peptide hydrazide made with Br_2 in glacial acetic acid involved a colour change at the end-point of colourless to faint-yellow in the absence of an indicator. Since there was so little difference between the initial and the final colour, the mol. wt. of the hydrazides could not be determined with any confidence.

In conclusion it may be stated that peptide hydrazides can be determined by simple titrimetric methods. Of the titrants tested, perchloric acid in glacial acetic acid with methyl violet as indicator appears to be the best as its stoichiometry is one-to-one, the end-point is sharp and stable and it gives the most accurate mol. wt. determinations. If the peptide hydrazide has an acid titratable group (e.g. compound 4, Table) the equivalence point changes accordingly. If, however, one wishes to perform aqueous titrations, then an oxidizing titrant would be of choice. Of those oxidants tested KMnO_4 or NaOBr with methyl red indicator appear to be the best. The disadvantage for general use of oxidizing titrants for determination of peptide hydrazides is the existence of oxidizable amino acids. Thus it is advantageous to have available both an acidimetric and an oxidimetric method.

Résumé. Nous avons déterminé par titrage volumétrique une série d'hydrazides peptidiques et testé les titrages acides, basiques et oxydants. Un tableau condense les résultats obtenus avec les trois meilleurs réactifs de titrage (acide perchlorique dans l'acide acétique glacial, l'hypobromite de sodium et le permanganate de potassium) qui sont tous utilisables à cet effet.

M. FRIDKIN and H. J. GOREN¹⁹

Department of Biophysics,
The Weizmann Institute of Science,
Rehovot (Israel), 29 December 1969.

¹⁸ A. PATCHORNICK and S. SHALTIEL, Bull. Res. Coun. Israel 11A, 224 (1962).

¹⁹ Acknowledgment. H. J. GOREN is grateful for the Post-doctoral Fellowship awarded him by the National Research Council of Canada, which enabled him to carry out this research.

Culture de cellules embryonnaires d'Urodèles sur un support-gel d'acrylamide

Les travaux de RAPPAPORT et al.¹ ont montré que pour qu'une cellule adhère, s'étale et se différencie sur une surface, celle-ci doit présenter certaines caractéristiques physico-chimiques, notamment: 1. une charge électrique suffisante par unité de surface pour permettre l'attachement d'un type cellulaire donné; 2. un mécanisme de protection de ces «sites» contre l'excrétion des protons par la cellule après attachement. Selon ces auteurs, ces paramètres doivent s'adapter aux caractéristiques de la cellule, sa taille, son métabolisme, ainsi que la densité de charge de sa membrane cytoplasmique.

D'autres auteurs se sont également intéressés au problème de «l'attachement» de cellules à un support. En particulier CURTIS² a développé plusieurs théories de

«l'attachement» des cellules au verre. Il suppose que cet attachement résulterait d'un équilibre entre les forces adhésives de van der Waals et les forces électrostatiques de répulsion dues aux charges de surface.

Nous nous sommes inspirés des travaux d'HOFFMAN et al.³ pour étudier l'action de certaines substances biologiques, séparées par électrophorèse sur gel, sur la différenciation cellulaire. Nous avons, dans ce travail préliminaire, recherché un support-gel permettant l'étalement et la différenciation de cellules embryonnaires d'Urodèles, selon une technique de culture déjà décrite^{4,5}.

Matériel. Les cellules utilisées pour effectuer ce travail sont des cellules embryonnaires de *Pleurodeles wallii* et d'*Ambystoma mexicanum* prélevées sur la plaque et les

bourrelets neuraux ainsi que sur le feuillet chordomésoblastique sous-jacent de neurulas.

Techniques. Pour que des cellules embryonnaires d'Amphibiens en culture puissent évoluer normalement, continuer leur croissance et se différencier, il est nécessaire qu'elles adhèrent à un support et s'y étalent. Or, nous avons pu constater, comme les auteurs précités, que la nature du support joue un rôle primordial dans l'étalement cellulaire. Ainsi, des cellules embryonnaires de Pleurodèle cultivées sur des lamelles de verre, de matière plastique, des lamelles recouvertes d'un film de carbone ou de paraffine, s'y étalent et montrent par la suite une différenciation morphologique normale des diverses catégories cellulaires. Par contre, ces mêmes cellules cultivées sur des lamelles de verre recouvertes de vaseline ne s'étalent pas et on n'observe pas de différenciation morphologique typique. Dans les myoblastes notamment, des myofibrilles striées apparaissent mais elles ne présentent aucune organisation typique; elles restent réparties de façon très anarchique dans le cytoplasme cellulaire⁶.

Pour pouvoir étudier l'action de substances biologiques incluses dans des gels, sur la différenciation de cellules embryonnaires, il était donc indispensable de préparer des gels sur lesquels les cellules puissent adhérer, s'étaler, croître et se différencier pendant plusieurs jours, sans présenter de signes de nécrose ou de dégénérescence. Les travaux d'HOFFMAN et al.³ et ceux d'ORNSTEIN et DAVIS⁷ nous ont guidé dans le choix initial de la composition des gels d'acrylamide.

Après leur préparation et leur stérilisation (autoclavage, UV, antibiotiques, filtration), les gels sont coulés dans des tubes de verre de 6 mm de diamètre et 70 mm de long, découpés en rondelles de 1 mm d'épaisseur qui sont placées dans les chambres de culture. Les cellules embryonnaires dissociées sont alors déposées sur les gels à l'aide d'une pipette Pasteur. Les cellules témoins sont déposées directement sur la lamelle de verre constituant le fond de la chambre de culture.

Nous avons étudié quel type de gel, parmi ceux cités ci-après, convenait le mieux aux cellules en culture: 1. Gels d'acrylamide à 3%, 7% et 9%. 2. Gels mixtes d'acrylamide-carboxyméthylcellulose et d'acrylamide-hydroxyéthylcellulose. 3. Gels d'agarose à 1,5% et gels mixtes d'acrylamide-agarose.

1. Dans une première série expérimentale, nous avons essayé comme support un gel d'acrylamide à 7% préparé selon la technique d'ORNSTEIN et DAVIS⁶, le catalyseur de polymérisation de l'acrylamide étant le persulfate d'ammonium. Pour éliminer la présence possible de substances non polymérisées, à la surface du gel, qui empêcheraient l'adhérence des cellules, nous avons procédé au lavage des rondelles de gel pendant 20 h avant de les introduire dans la chambre de culture. Certaines ont été lavées dans la solution tampon Tris-HCl, pH 8,1, utilisée pour la préparation du gel, d'autres dans le milieu opératoire, d'autres encore dans le milieu de culture proprement dit. Les cellules cultivées sur les rondelles de gels lavées, ou non, dans la solution tampon et la solution opératoire ne s'étalent que dans une très faible proportion. La majorité d'entre elles restent arrondies puis dégèrent. Les cellules cultivées sur les rondelles de gels lavées dans le milieu de culture s'étalent en plus grand nombre, se divisent et se différencient. Cependant ces dernières constituent une minorité par rapport à l'ensemble des cellules introduites dans la culture. D'après RAPPAPORT (1), ce phénomène ne correspondrait ni à une sélection, ni à une adaptation de quelques cellules. Dans une autre série d'expériences, dans laquelle nous avons remplacé le persulfate d'ammonium par un autre catalyseur, la riboflavine, nous n'avons pas

obtenu de meilleurs résultats. D'autres concentrations (3% et 9% d'acrylamide ont été utilisées et n'ont apporté aucune amélioration.

2. Nous avons alors modifié les propriétés physico-chimiques des gels d'acrylamide par incorporation d'autres substances telles que la carboxyméthylcellulose à 0,4%, l'hydroxyéthylcellulose à 0,4%. Le gel mixte d'acrylamide-carboxyméthylcellulose ne permet l'étalement que d'une faible proportion de cellules. Quant aux gels mixtes d'acrylamide et d'hydroxyéthylcellulose, ils inhibent totalement l'étalement cellulaire.

3. Pour la préparation des gels mixtes d'acrylamide-agarose, nous avons utilisé la méthode d'URIEL⁸. Le mélange des solutions d'agarose et d'acrylamide stérilisées séparément, effectué à 55°C, est rapidement coulé dans les tubes de verre. Les gels sont ensuite découpés, lavés successivement dans 3 bains de milieu opératoire puis dans un bain de milieu de culture. Les ϵ d'acrylamide utilisées ont été de 3%, 7% et 9%, celle d'agarose étant de 0,80%.

Tandis que les gels mixtes d'acrylamide-agarose à 3% (et les gels d'agarose seul à 1,5%) n'ont pas permis l'adhérence et l'étalement des cellules, les gels mixtes d'acrylamide-agarose à 7% et 9% ont favorisé l'étalement et la différenciation des cellules. Dans ce cas en effet, les cellules cultivées sur ce type de gel s'étalent en grand nombre et la différenciation morphologique des diverses catégories cellulaires se manifeste comme pour les cellules-témoins.

Conclusion. De ces diverses expériences il ressort que l'état physico-chimique du support (porosité, composition chimique des gels) ainsi que les interactions possibles entre milieu de culture et support, sont des facteurs qui ont une importance certaine dans les phénomènes étudiés. En conclusion, ces résultats soulignent le rôle primordial joué par le contact support-membrane cellulaire dans l'étalement de cellules embryonnaires cultivées in vitro et par là-même dans le processus de la différenciation morphologique typique.

Summary. Culturing amphibian embryonic cells on different supports suggests the important role played by the contact between support and cellular membrane in spreading and morphological differentiation of these cells. They spread on glass but do not spread when glass is covered by acrylamide gels (3%, 7% and 9%), by acrylamide-carboxymethylcellulose, or acrylamide-hydroxyethylcellulose gels, or by agarose gel (1,5%). Nevertheless, cells spread and differentiate on mixed acrylamide (7% or 9%) agarose (0,80%) gels.

C. MATHIEU, A. M. DUPRAT
et J. P. ZALTA

Laboratoires de Biologie Générale et
Chimie Biologique, Faculté des Sciences,
F-31 Toulouse (France), 8 novembre 1969.

1. C. RAPPAPORT, J. P. POOLE et H. P. RAPPAPORT, *Expl. Cell Res.* 20, 465 (1960).
2. A. S. G. CURTIS, *J. Cell Biol.* 20, 199 (1964).
3. H. HOFFMAN, M. A. NAUGHTON, J. McDUGALL et E. A. HAMILTON, *Nature* 214, 703 (1967).
4. A. M. DUPRAT, Thèse Doctorat d'Etat, Fac. Sc. Toulouse No. 787 C.N.R.S. No. 2971 (1969).
5. A. M. DUPRAT, J. P. ZALTA et J. C. BEETSCHEN, *Expl. Cell Res.* 43, 358 (1966).
6. T. R. ELSDALE, communication personnelle.
7. L. ORNSTEIN et B. J. DAVIS, *Disc electrophoresis* (Dist. Prod. Ind. Rochester, New York 1962).
8. J. URIEL, *Bull. Soc. Chim. biol.* 48, 969 (1966).