

induced mammary tumors in Sprague Dawley rats, using intravenous DMBA according to the HUGGINS⁵ procedure, and in parallel experiments administered 25 µg of actinomycin D i.p. 20 min before, after or simultaneously with the carcinogen.

Rats that received DMBA alone first developed easily palpable mammary tumors 50 days later; animals surviving challenge with both drugs evidenced fewer such tumors during the arbitrary period of observation from 50 to 200 days (Table). These preliminary findings suggest that systemic actinomycin D at least delayed the appearance of palpable tumors, and in most animals may in fact have prevented their development. Rats that received one or both drugs and were sacrificed or died during the period studied almost invariably showed adrenal calcification whether palpable mammary tumors were present or not. Although there is evidence that actinomycin D can damage the adrenal glands⁶, histologic examination of these glands from the first 3 groups of rats suggests that the drug did not prevent the eventual regeneration of DMBA-damaged adrenals. In addition we found no reduction in blood pressure measured externally with a sphygmomanometer, when rats treated with one or both drugs were compared to normals. It has been reported that adrenalectomy enhances the growth of 3-methylcholanthrene-induced rat mammary cancer⁷, consequently adrenal damage and impaired regeneration might have been expected to further the development of mammary cancer. It has also been shown that adrenalectomy does not significantly affect the incidence of this carcinogen-induced rat mammary tumor⁸.

Examination of the estrous cycles in rats from all groups by the Papanicolaou technique failed to reveal any abnormality. Administration of DMBA did not alter their frequency⁹, and administration of actinomycin D as

described does not appear to do so either. This suggests that when rats were challenged with both DMBA and actinomycin D, pituitary-ovarian function was not drastically impaired. This further implies that in all groups FSH, LH and possibly prolactin are present in sufficient amounts to support the estrous cycle. There is evidence that for 5 months after DMBA administration no significant change in pituitary weight or histology occurs¹⁰; in addition actinomycin D apparently does not easily cross the blood brain barrier⁶. The gain in weight of animals in Groups I-V lagged behind untreated controls, but statistical differences among treated groups were not found. Thus there is reason to believe that several of the primary endocrine organs that influence rat mammary tumor development were not prevented from achieving or maintaining essentially normal function by challenge with either one or both drugs.

Whether the mammary gland is the primary site of interaction with actinomycin D or is secondarily affected due to some more fundamental effect at another site(s) is not certain. For reasons presented, neither the pituitary, adrenals nor ovaries seem to be the site of this hypothetical effect¹².

Zusammenfassung. Sprague-Dawley-Ratten, die eine kombinierte Belastung mit 7,12-Dimethylbenz(α)anthrazen und Aktinomycin D überleben, weisen eine drastisch erniedrigte tastbare Tumorzinzidenz auf. Kontrolltiere erhielten nur das Karzinogen.

K. M. ANDERSON and J. A. KELLEN

*Department of Pathological Chemistry,
University of Toronto, Toronto 181 (Ontario, Canada),
2 March 1970.*

Incidence of palpable mammary tumors in treated rats, observed from 50 to 200 days after treatment

Group	Agent	Total number	Tumors	Tumor incidence (%)
I	DMBA	13	13	100
II	AD	21	6	28
III	DA	20	5	25
IV	S	9	2	22
V	A	9	0	0

Rats were obtained from the Sprague Dawley Company of Madison, Wisconsin, and maintained on Rockland mouse/rat diet and water ad lib. AD, actinomycin D 20 min before DMBA; DA, the reverse order; S, DMBA followed by Actinomycin D within 1 min; A, 25 µg of Actinomycin i.p. The period of observation from 50-200 days was chosen for convenience. Rats treated with both agents exhibited an enhanced mortality during the first 5-30 days after challenge, in accord with reports of increased sensitivity of adrenalectomized rats to Actinomycin D¹¹.

¹ C. HUGGINS, S. MORII and L. GRAND, *Ann. Surg.* 154, 315 (1961).

² P. SHUBIK and A. L. RITCHIE, *Cancer Res.* 13, 343 (1953).

³ R. R. BATES, J. S. WORTHAM, W. B. COUNTS, C. W. DINGMAN and H. V. GELBOIN, *Cancer Res.* 28, 27 (1968).

⁴ T. L. DAO, *Prog. exp. Tumor Res.* 11, 235 (1967).

⁵ C. HUGGINS, L. GRAND and R. FUKUNISHI, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 51, 737 (1964).

⁶ U. STENRAM, *Z. Zellforsch.* 94, 282 (1969).

⁷ P. M. DANIEL and M. M. L. PRICHARD, *Int. J. Cancer* 2, 619 (1967).

⁸ C. HUGGINS, L. C. GRAND and F. P. BRILLANTES, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 45, 1294 (1959).

⁹ C. HUGGINS, L. C. GRAND and F. P. BRILLANTES, *Nature* 189, 204 (1961).

¹⁰ T. L. DAO, in *Endogenous Factors Influencing Host-Tumor Balance* (Eds. R. W. WISLER, T. L. DAO and S. WOOD; University Chicago Press, Chicago, Illinois 1967), p. 75.

¹¹ F. S. PHILIPS, H. S. SCHWARTZ, S. S. STERNBERG and C. T. C. TAN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 89, 348 (1960/61).

¹² Acknowledgment. We would like to thank Prof. CH. B. HUGGINS, Director of the Ben May Laboratory for Cancer Research at the University of Chicago for his kind gift of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene. This work was supported by a grant from the Ontario Cancer Treatment and Research Foundation.

Evolution de l'épithélium gastrique isolé de son mésenchyme et cultivé in vitro au contact du foie

Associé au foie d'embryons de Poulet et de Lapin, l'épithélium gastrique de fœtus de Lapin se transforme profondément¹⁻³. Après 6 jours de culture, il encercle une vésicule vide bordée d'un mince feuillet épithélial monocellulaire et discontinu.

Les techniques de coloration classiques utilisées, ne nous permettent pas d'évaluer la part de responsabilité des 2 types de cellules, gastriques et hépatiques, dans le déroulement des phénomènes observés. Or, LE DOUARIN et BARQ⁴ montrent que dans les cas d'associations de

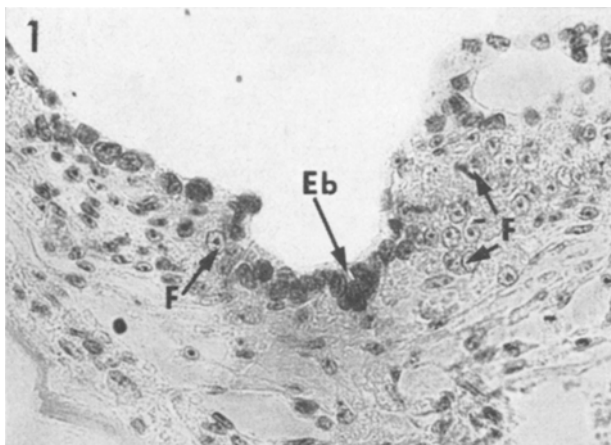


Fig. 1. Association d'épithélium gastrique et de foie, cultivée 5 jours. Les cellules hépatiques (F) s'infiltrant dans la couche basale de l'épithélium (Eb) et provoquent son morcellement. La partie apicale de l'épithélium est totalement détruite ($\times 500$).

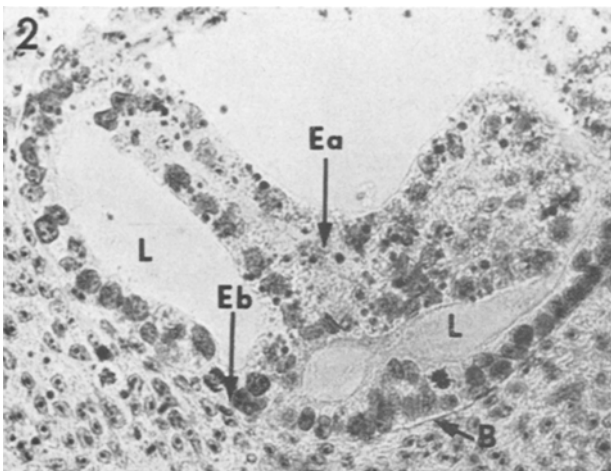


Fig. 2. L'épithélium, cultivé 4 jours forme une vésicule interne, entourée par le foie. Les lacunes gastriques (L) sont hypertrophiées et les cellules apicales, groupées en une masse unique (Ea). L'épithélium basal (Eb) est sain et en pleine croissance (mitoses) ($\times 500$).

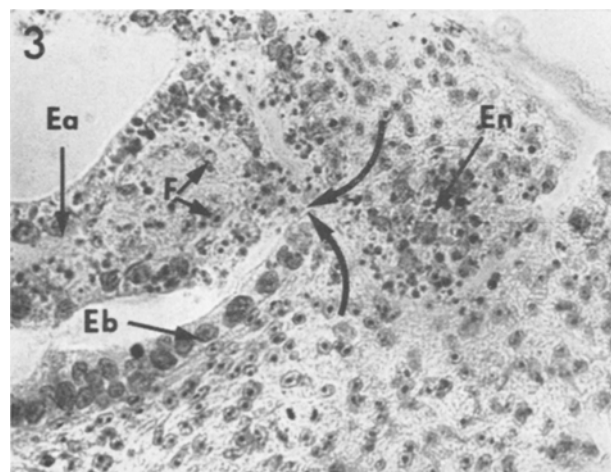


Fig. 3. La même association comme Figure 1. La membrane basale est interrompue (flèches) et laisse pénétrer des cellules hépatiques (F) dans l'îlot central (Ea). Le foie a également isolé un nodule épithélial (En) dans son parenchyme. Nodule intrahépatique et épithélium apical sont déjà fortement lysés ($\times 500$).

tissus provenant l'un de la Caille et l'autre du Poulet, la réaction nucléale de Feulgen et Rossenbeck permet de distinguer nettement l'origine des 2 types de noyaux interphasiques en présence: la chromatine du noyau de la Caille est condensée en une masse centrale unique ou répartie en petits amas, tandis que celle du Poulet est distribuée dans l'ensemble du noyau.

A notre tour, nous avons examiné la localisation du matériel Feulgen-positif dans le noyau de l'estomac du Lapin et nous avons constaté que ce noyau se distinguait aisément de celui de la Caille par sa taille (7 à 8 μ pour le Poulet et 5 μ pour la Caille) et par sa chromatine uniformément répartie, lui conférant une teinte rouge prononcée. Ces résultats nous ont encouragés à entreprendre l'examen histologique d'associations de foie d'embryon de Caille et d'épithélium gastrique de fœtus de Lapin afin d'étudier le déroulement des transformations survenant au sein des 2 tissus mis en présence, en culture *in vitro*.

Matériel et technique. Le foie provient d'embryon de Caille au 7^{ème} jour de l'incubation et l'estomac, de fœtus de Lapin âgés de 16 jours. L'estomac est dissocié selon la technique habituelle¹ et l'épithélium séparé de son mésenchyme est déposé sur une fine tranche de foie. Les 2 tissus associés sont emballés dans la membrane vitelline⁵ et cultivés sur le milieu gélosé de WOLFF et HAF-FEN⁶, enrichi de sérum de Poulain. Après 2 à 6 jours, les pièces sont fixées au liquide de Zenker et les coupes soumises à la réaction nucléale de Feulgen et Rossenbeck en vue de l'examen histologique.

Résultats. Au moment de la transplantation (16^{ème} jour de la vie fœtale) l'épithélium gastrique, posé à plat sur le foie, se présente sous la forme d'une couche pseudo-stratifiée encore indifférenciée et percée dans sa zone médiane de petites lacunes internes.

Durant les 2 premiers jours de culture, les cellules du parenchyme hépatique migrent et viennent encercler l'épithélium qui prend une position interne et se replie en une vésicule. Alors que dans la morphogénèse normale, les lacunes épithéliales augmentent sensiblement de taille et s'ouvrent secondairement dans la lumière stomacale donnant ainsi naissance aux premières villosités gastriques, dans le cas de nos associations l'évolution s'effectue différemment: les lacunes internes subissent une dilatation plus accentuée, ce qui provoque l'étranglement des ponts cellulaires qui les séparent, leur rupture et enfin la scission partielle de l'ensemble de la couche épithéliale apicale. Les cellules de cette zone décollée s'organisent en nodules qui s'accrochent bientôt les uns aux autres pour former une masse épithéliale unique au centre de la lumière vésiculaire. Pendant ce temps, la couche inférieure de l'épithélium située au contact du tissu hépatique se développe normalement tandis que la membrane basale s'estompe à plusieurs niveaux et que le foie commence à s'infiltrer dans l'épithélium (Figure 1); là, il cerne de petits groupes de cellules qu'il parvient progressivement à détacher et à entraîner à l'intérieur de son parenchyme.

Au cours des 3 jours suivants, les cellules du foie poursuivent leur envahissement, elles écartent à plusieurs

¹ D. DAVID, C. r. Acad. Sci. Paris, Série D, 264, 1062 (1967).

² D. DAVID, C. r. Soc. Biol. 162, 1142 (1968).

³ D. DAVID, Ann. Emb. Morph. 2 (1969), sous presse.

⁴ N. LE DOUARIN et G. BARG, Colloque sur la Biologie de la Caille (Clermont-Ferrand). In Bull. Biol. France et Belgique, sous presse.

⁵ ET. WOLFF, Devl. Biol. 3, 767 (1961).

⁶ ET. WOLFF et K. HAFEN, Texas Rep. Biol. Med. 10, 463 (1952).

endroits les bords du feuillet épithélial et pénètrent, accompagnées de nombreuses cellules sanguines, dans la lumière vésiculaire. Elles s'infiltrèrent ensuite à l'intérieur de la masse cellulaire résultant du décollement de l'épithélium apical et provoquent sa lyse progressive. De même, les nodules épithéliaux entraînés précédemment dans le parenchyme, sont progressivement résorbés (Figures 2 et 3).

Après 6 jours de culture, l'épithélium ne forme plus qu'un mince feuillet monocellulaire et discontinu, il tapisse une vésicule interne large et vide.

Conclusions. Nos expériences d'associations, en culture in vitro, de foie et d'épithélium gastrique montrent qu'il y a incompatibilité entre les 2 tissus mis en présence. Cette intolérance se manifeste sous 2 aspects principaux: 1. Réaction propre de l'épithélium gastrique qui se caractérise: a) par l'hypertrophie des lacunes internes conduisant à la rupture de la zone apicale, puis à la formation de nodules au centre de la vésicule, enfin à la réunion de ces petits groupes en une masse épithéliale unique; b) par l'effacement partiel de la membrane basale. 2. Réaction

du tissu hépatique: a) le foie encercle l'épithélium qui devient interne; b) il s'infiltré entre les cellules de l'épithélium et morcelle ce dernier en petits nodules qui sont ensuite entraînés à l'intérieur du parenchyme hépatique; c) le foie s'insinue aussi dans la lumière vésiculaire, où, avec l'aide des cellules sanguines, il provoque la lyse progressive mais totale de la masse cellulaire apicale détachée précédemment de l'épithélium gastrique.

Summary. In experiments of associations of gastric epithelium with liver, proceeding respectively from rabbit and quail embryos, the Feulgen and Rossenbeck's nuclear reaction permits us to distinguish the gastric nuclei from the hepatic nuclei and consequently, to observe the cellular movements in both associated tissues.

D. DAVID

*Laboratoire de Biologie animale, Faculté des Sciences
F-63 Clermont-Ferrand (France), 23 Octobre 1969.*

The Margin of Overgrowth of the Embryonic Chick Blastoderm as a Study Model for Cell-To-Cell Contacts

Cell-to-cell contacts are important in the study of invasiveness of cancer cells. The margin of overgrowth¹ of the chick germ appeared to be a suitable site for the study of such relationships. The cells, forming the periphery of the germ, show a long cytoplasmic offshoot, comparable to the leading edge of a moving fibroblast in culture². Moreover, during the first hours of chick germ development, they move over the vitelline membrane rather quickly. We therefore investigated how these edge cells would behave when in contact with various other cells.

Fresh eggs from commercial stock are incubated for 6 h. They then fulfill VAKAET's stage 2 to 3³. They are then explanted in vitro following New's technique⁴. It proved important in these experiments to use germs with a yolk-free margin of overgrowth. We therefore carefully removed the yolk from the peripheral parts of the germ.

The following grafts have been placed on the vitelline membrane near the margin of overgrowth: pieces of 9-day-old chick embryo mesonephros (12 cultures); pieces of 9-day-old chick embryo tibio-tarsal skin (12 cultures); pieces of millipore filter (8 cultures) and Hela cells from monolayer cultures (21 cultures).

Cultures are incubated at 37.5°C for 24 h. Figure 1 presents the experimental design schematically. During the incubation, time-lapse cinematography has been performed, taking one frame every 30 sec. The following results are based mainly on these records. During incubation, the chick germ increased its overall diameter over ± 10 mm, through a general extension of the margin of overgrowth over the vitelline membrane. The mesonephros, the skin, and the millipore filter, do not inhibit the expansion of the germ (32 cultures). In all these

cultures, the grafts are taken up by the peripheral parts of the germ.

Generally, the margin of overgrowth shows a normal evolution in these cases (23 out of 32 cultures). At most there is a little retardation in its development, which sometimes is still visible peripherally to the graft at the end of the culture (9 out of 32 cultures) (Figure 2).

Hela cells, on the contrary, do disturb the normal evolution of the margin of overgrowth. As soon as the edge cells make contact with the Hela cells, they sud-

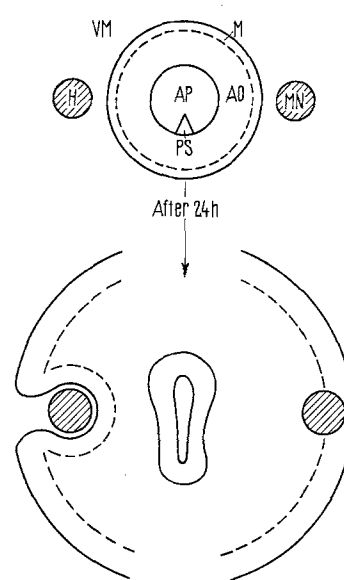


Fig. 1. Schematic representation of the evolution of the margin of overgrowth (M) in contact with Hela cells (H) and mesonephros (MN). PS, primitive streak; AP, area Pellucida; AO, area opaca VM, vitelline membrane.

¹ M. BLOUNT, J. Morph. 20, 1 (1909).

² R. BELLAIRS, A. BOYDE and J. HEAYSAN, Wilhelm Roux' Arch. EntwMech. 163, 113 (1969).

³ L. VAKAET, J. Embr. exp. Morph. 10, 38 (1962).

⁴ D. NEW, J. Embr. exp. Morph. 3, 326 (1955).