

Les coupes d'une épaisseur moyenne de 60 μm ont été examinées en fluorescence et comparées aux microradiographies correspondantes.

Résultats. Lorsque les animaux sont sacrifiés quelques heures après l'injection de Lumomagnéson, l'examen des coupes transversales diaphysaires révèle la présence d'une fluorescence de couleur rouge-brique disposée en anneaux ostéoniques récemment déposés, c'est-à-dire au contact des lisérés préosseux et en dépôts linéaires sous-périostiques et endostiques de bordure. Les coupes longitudinales métaphysaires présentent une zone de fluorescence immédiatement sous le cartilage de croissance, indiquant l'imprégnation par le fluorochrome du cartilage récemment minéralisé. Les coupes transversales pratiquées au même niveau confirment cette observation. Aux échéances plus tardives soit jusqu'à quinze jours après l'injection de fluorochrome, les zones de fluorescence sont enfouies sous de nouvelles couches osseuses lamellaires, soit au sein des ostéones, soit aux niveaux sous-périostiques et endostiques.

Discussion. Il apparaît que le marquage par le Lumomagnéson, vu en fluorescence, ne diffère en rien, au point de vue des localisations, de celui des tétracyclines que l'on a coutume de prendre comme référence puisque ses modalités paraissent les mieux connues. C'est la raison pour laquelle, il n'a pas été jugé nécessaire d'en faire la démonstration photographique. Aux échéances brèves et par comparaison aux microradiographies, selon la technique utilisée par GHOSEZ¹⁴ pour la tétracycline, nous avons pu établir que ce marquage se situe au niveau de la ligne-frontière du liséré préosseux. Aucune autre structure n'est rendue fluorescente, que ce soit des logettes ostéocytaires, les surfaces neutres ou les zones de résorption. On sait en effet qu'au niveau des logettes ostéocytaires une certaine confusion est parfois possible. La tétracycline peut imprégner les parois de ces logettes mais selon des modalités actuellement mal connues; cette imprégnation est parfois irrégulière, certaines logettes sont fluorescentes, d'autres pas, sans que l'on en connaisse la raison. De plus, certains artefacts, tels que la présence d'air ou une fixation insuffisante des pièces, peuvent donner l'aspect d'une pseudo-fluorescence de couleur jaune par effet optique. Enfin certains fluorochromes, comme l'alizarine observée à brève échéance, peuvent imprégner fortement toutes les surfaces non seulement celles qui présentent une ostéogénèse mais aussi les logettes ostéocytaires, les surfaces indifférentes et les zones de résorption. Par contre, le Lumomagnéson se comporte comme les porphyrines; son marquage très précis ne concerne que les zones d'ostéogénèse ou de calcification.

A plus longue échéance, le marquage par Lumomagnéson est bien enfoui au sein de l'ostéone, sous forme d'un anneau régulier concentrique au canal de Havers. Aucune autre structure n'est illuminée. Cet anneau concerne

exclusivement l'ostéogénèse en cours au moment de l'administration du produit.

Tous les animaux injectés ont présenté un marquage fluorescent, quels que soient la quantité de produit utilisé, le mode d'injection employé et l'échéance d'observation, après quelques heures ou après 15 jours. Le nombre d'animaux injectés est suffisant pour affirmer la régularité et la constance de l'incorporation du Lumomagnéson dans le tissu osseux.

La précision, l'importance du marquage et ses localisations identiques indiquent que le Lumomagnéson se comporte comme les autres marqueurs, en se liant soit à la trame collagène soit au minéral en voie de dépôt.

Le traitement des pièces osseuses pendant quelques heures, soit par HCl, 0,1 N soit par EDTA (versène) amène la disparition complète de la fluorescence. Cependant ni les examens prolongés en rayonnement ultraviolet ni les nombreuses manipulations sans précautions particulières n'ont altéré l'intensité et la stabilité de la fluorescence.

Compte tenu des techniques d'injection, du type d'animal utilisé et des délais d'observations, le Lumomagnéson n'a apparemment provoqué aucun phénomène toxique observable tant au plan général qu'au niveau de l'évolution de l'ostéogénèse. S'il est donc utilisable dans les conditions habituelles d'expérimentation animale, on ne peut cependant parler de toxicité nulle puisqu'aucune analyse toxicologique n'a été exécutée.

En conclusion, le Lumomagnéson est un marqueur fluorescent du dépôt minéral global de l'os. Il est stable et peu coûteux. Son utilisation est extrêmement simple. Il prend place dans l'arsenal déjà bien fourni des marqueurs *in vivo* de l'ostéogénèse générale et de la minéralisation du cartilage de croissance dans le premier stade de l'ossification endochondrale.

Summary. Lumomagneson is reported as detector of magnesium by mean of fluorometry. When injected *in vivo* in young dogs, it is suitable as fluorescent marker of the mineral deposit in all sites of ossification, but it is not suitable for distinguishing between calcium and magnesium deposits.

L. COUTELIER¹⁵

*Laboratoire de Recherches de chirurgie orthopédique,
Université Catholique de Louvain,
12, Minderbroederstraat
B-3000 Louvain (Belgique), 28 juin 1972.*

¹⁴ J. P. GHOSEZ, Clich. Biol. Liège 70, 169 (1959).

¹⁵ Ce travail a bénéficié de l'aide du Fonds de la Recherche Scientifique Médicale et de la Commission des Communautés Européennes.

Effects of Metopirone on Duodenal Differentiation and Yolk Sac Retraction in Chick Embryos¹

Adrenocorticoid injection accelerates² and 'hypophysectomy'³ arrests duodenal differentiation and yolk sac retraction in chick embryos, implying that adrenocorticoids are important for these developmental processes.

Since no one has reported successful adrenalectomy of chick embryos we hoped that metopirone (an inhibitor of 11- β -hydroxylase), would specifically block 11- β -oxycorticosteroid synthesis⁴ in chick embryos and presumably show the effects of deprivation on the development of these apparently corticoid dependent or stimulated

processes. Metopirone, probably hormonally inactive⁴ was not toxic when even as much as 4.0 mg per embryo was given on days 12, 14, 16 and 18 of incubation (SKIDD)⁵. But, such treatments slightly decreased adrenal gland weights.

We compared rates of body growth, yolk sac retraction and duodenal differentiation (alkaline phosphatase specific activity, protein content, morphogenesis) assessed as before^{3,6-8} in intact White Leghorn chick embryos (PB-58) incubated at $\sim 39^\circ\text{C}$ and 60% relative humidity.

Egg shells were 'windowed' on day 2 of incubation and closed with adhesive tape. Metopirone, 0.5, 1.0, or 1.5 mg in 0.1 ml, 0.9% saline was injected into the chorioallantoic vesicle, daily between days 16 and 19; totals of 2.0, 4.0 and 6.0 mg per embryo. Embryos were killed at 19.5 days. Controls received saline only in a duplicate regime. Means \pm standard errors were compared by Duncan's new multiple range test⁹ at the 1 and 5% levels of significance.

Treatment did not change fresh body weight, fresh or lyophilized duodenal weight, percent water, relative duodenal weight, total duodenal protein content (Table) or rates of morphogenesis. However, duodenal alkaline phosphatase specific activity was significantly increased. Yolk sac retraction did not proceed beyond the 18-day level (Table). The yolks were obviously condensed. This may imply that duodenal alkaline phosphatase activity was affected by factors (hormones?) other than adrenocorticoids which did not repair yolk sac retraction.

Thyroxine injections can accelerate general development of chick embryos¹⁰. Also, thyroxine and hydrocortisone, alone or together precociously induce duodenal differentiation in intact embryos and alleviate duodenal developmental arrest in 'hypophysectomized' chick embryos¹¹. Thus, thyroxine can replace corticoids in some respects in duodenal differentiation but trophic hormones are not required. Perhaps metopirone reduced adrenocorticoid levels enough to retard yolk sac retraction but in some way elevated endogenous thyroid hormone and/or STH (or other hormone?) levels. This may have accelerated duodenal alkaline phosphatase specific activity^{6,7} but did not restore yolk sac retraction. Duodenal development has not been accelerated beyond the day 19 level^{2,8} except by pars distalis grafts in 'hypophysectomized' embryos^{6,7,12}. Our results indicate that metopirone treatments also significantly accelerate duodenal alkaline phosphatase activity above the day 19 level by some unknown mechanism.

Résumé. Administré à l'embryon de poulet, le métopirone accélère la phosphatase alcaline du duodénum, mais retarde la rétraction du sac vitellin. On suppose que ces deux stades sont stimulés par les adrénocorticoïdes endogènes. Il est possible que la thyroxine ou d'autres hormones accélèrent aussi la phosphatase alcaline du duodénum, mais ne rétablissent pas la rétraction du sac vitellin.

H. W. HULAN and T. W. BETZ

Department of Biology, Carleton University,
Ottawa (Canada K1S 5B6), 14 June 1972.

¹ Supported by a NRC grant to TWB; HWH acknowledges a NRC postdoctoral fellowship. Our thanks to CIBA for metopirone gifts and to D. L. MALLON and S. SKIDD for technical assistance.

² F. MOOG and D. RICHARDSON, *J. exp. Zool.* 130, 29 (1955).

³ T. W. BETZ, *Gen. comp. Endocrin.* 9, 172 (1967).

⁴ A. I. FRANKEL, *Poult. Sci.* 49, 869 (1970).

⁵ S. SKIDD, unpublished data.

⁶ D. E. HART and T. W. BETZ, *Devl. Biol.* 27, 84 (1972).

⁷ D. E. HART and T. W. BETZ, *Gen. comp. Endocrin.*, 79, 225 (1972).

⁸ R. B. GOLDBERG, M. Sc. Thesis, Carleton University, Ottawa (1971).

⁹ D. B. DUNCAN, *Biometrics* 11, 1 (1955).

¹⁰ T. W. BETZ, *Hormones in Development*, (Eds. M. HAMBURGH and E. J. W. BARRINGTON; Appleton-Century-Crofts, New York, (1971), p. 75).

¹¹ T. W. BETZ and D. L. MALLON, *Am. Zool.* 10, 321 (1970).

¹² F. T. BELLWARE and T. W. BETZ, *J. Embryol. exp. Morph.* 24, 335 (1970).

Response of mean^A (\pm S.E.) body weight, duodenal weight, percent water, total duodenal protein, alkaline phosphatase specific activity and yolk sac retraction in 19.5 day-old intact chick embryos treated with metopirone

	Number of embryos	Fresh body wt. (g)	Fresh duodenal wt. (mg)	Lyophilized duodenal wt. (mg)	Water (%)	Fresh duodenal wt. relative to fresh body wt. (mg/mg)	Total duodenal protein B (mg)	Specific alkaline phosphatase activity C	Specific alkaline phosphatase activity D	Yolk sac retraction
Control	10	18.65 \pm 0.64	36.79 \pm 1.88	5.45 \pm 0.27	85	1.97 \pm 0.08	5.10 \pm 0.27	2236 _{a, e} \pm 163	6141 _{a, e} \pm 419	Normal
Metopirone										
2 mg	10	19.07 \pm 0.96	39.63 \pm 2.61	5.99 \pm 0.37	84	2.07 \pm 0.07	5.62 \pm 0.20	2781 _{a, b, e} \pm 141	7238 _{a, b, e} \pm 555	None
4 mg	10	19.30 \pm 0.65	40.38 \pm 2.30	6.24 \pm 0.40	84	2.09 \pm 0.09	5.24 \pm 0.23	3524 _{b, d} \pm 314	8744 _{b, d} \pm 611	None
6 mg	10	19.39 \pm 0.80	37.85 \pm 1.37	5.51 \pm 0.44	85	1.96 \pm 0.06	5.18 \pm 0.20	3075 _{b, c, d} \pm 158	8256 _{b, c, d} \pm 587	None

^A Means with same superscripts are not significantly different (^{a, b} $p < 0.01$; ^{c, d} $P < 0.05$). ^B Estimated by the technique of LOWRY et al.⁶. ^C Units as per the MANNING et al. assay, relative to total duodenal protein⁶. ^D Units as per the MANNING et al. assay, relative to fresh duodenal weight⁶.