

weight-gain, fetal weight and fetal resorptions are similar to but not as pronounced as the finding of HUDSON and TIMIRAS¹². These investigators administered nicotine at 2, 6 and 10 mg/kg/day to rats from gestation Day 0 to Day 21 or from Day 0 to Day 7 only. They found that the percentage of resorptions increased and that body weight of the offspring decreased when increasing amounts of nicotine were administered. The authors suggested that nicotine affects processes operative during the first week of gestation and that these effects may be manifested in developmental disturbances in later growth stages. Results of the present study, however, demonstrate that fetal development is also affected even when nicotine administration is initiated after the first third of gestation.

In the rat a transport system for iron develops in the placenta¹³ and on the 16th day of gestation iron can be transmitted to the fetus by this system¹⁰. Since accumulation of iron from maternal transferrin by the placenta is a process which is not dependent upon the presence of a normal fetus¹³, ⁵⁹Fe uptake can be used as one index of placental function. As shown by data in Table II iron nuclide was effectively accumulated by the placenta of control animals and was transported to the fetus on the 16th day of gestation. Nicotine at 1 mg/kg/day did not significantly influence uptake and transport of ⁵⁹Fe by the placenta. In rats receiving nicotine at 2 and 6 mg/kg/day placental uptake of iron was depressed significantly. Approximately 40% less iron was present in the fetal-placental unit of rats receiving nicotine. Furthermore, on a weight basis, nuclide transport by the placenta was reduced 22 to 34%.

Results of the present study support the findings of other investigators that nicotine ingestion adversely affects fetal weight-gain. In addition, however, results from the study show that nicotine adversely affects placental growth and at least one aspect of placental function, namely, accumulation and transport of iron. Investigations on the effect of nicotine on other biochemical and morphological parameters of placental development, metabolism and transport may provide insight into how and to what extent cigarette smoking may affect gravid women and their fetuses.

Zusammenfassung. Nikotin in 1, 2 und 6 mg/kg täglichen Dosen in Ratten vom 9. bis zum 15. Tage der Trächtigkeit s.c. injiziert verursachte herabgesetzte Gewichtszunahme der Mutter sowie geringeres Wachstum des Fötus und der Plazenta. Bei einer täglichen Dosis von 2 und 6 mg/kg Nikotin war die ⁵⁹Fe-Anreicherung in der Plazenta beträchtlich vermindert.

R. J. B. GARRETT

College of Pharmacy, University of Kentucky,
Lexington (Kentucky 40506, USA), 13 November 1974.

¹² D. B. HUDSON and P. S. TIMIRAS, Biol. Reprod. 7, 247 (1972).

¹³ M. M. MANSOUR, A. R. SCHULERT and S. R. GLASSER, Am. J. Physiol. 222, 1628 (1972).

Etude par immunofluorescence de l'apparition de protéines contractiles, myosine et actine, dans des Myoblastes d'Amphibiens en différenciation in vitro

Immunofluorescence Studies on the Appearance of Myosin and Actin During in vitro Differentiation of Amphibian Myoblasts

Le but de notre travail a été d'étudier un aspect de la différenciation morphologique in vitro des myoblastes d'Urodele et plus particulièrement d'effectuer une étude comparative de l'apparition et l'évolution de protéines myofibrillaires, myosine et actine, à l'aide de la technique d'immunofluorescence qui permet de déceler avec précision la présence d'une quantité minime de ces protéines.

Matériel et méthodes. — *Préparation du matériel embryonnaire et immunofluorescence.* Des cultures de cellules prélevées sur la paroi dorsale de jeunes neurulas (St. 13) de *Pleurodeles waltlii* sont effectuées selon une technique déjà décrite¹. La technique d'immunofluorescence indirecte utilisée est essentiellement la même que celle déjà publiée^{2,3}.

Préparation des antigènes et antisérum. Les détails de la préparation des antigènes, leur identification, le contrôle de leur pureté, l'absorption des antisérum, etc... sont décrits dans de précédentes publications²⁻⁴.

Contrôles. Cellules: 1. Transférées seulement dans le tampon salin; 2. traitées au SwAR/FITC (Sevac) seulement; 3. traitées avec du sérum anti-myosine (anti-actine) seulement; 4. où le sérum normal de lapin est utilisé à la place de l'antisérum antimyosine (anti-actine). Tous ces contrôles ont donné des résultats négatifs.

Résultats. A 18°C, 3 à 4 jours sont nécessaires aux cellules pour s'attacher et s'étaler sur le support. A ce stade, les myoblastes généralement fusiformes ne présentent encore aucune autre différenciation morpholo-

gique. A partir de ce moment, il n'y a plus de mitose dans cette catégorie cellulaire. Ce n'est qu'après le 5e jour de culture que la striation myofibrillaire commence à être visible en microscopie à contraste de phase, dans la zone paranucléaire. Au cours des jours qui suivent, les myofibrilles progressent vers les extrémités de la cellule, dont la plage cytoplasmique s'accroît. La différenciation morphologique de la cellule musculaire est complète au 10e jour de culture environ¹.

Il est à noter que la cytodifférenciation des myoblastes d'Urodeles se déroule normalement in vitro bien que ces cellules restent souvent complètement isolées⁵. La fusion des myoblastes n'est pas nécessaire. Ceci est contraire à ce qui se passe pour la différenciation de cellules isolées de muscle squelettique d'embryons d'Oiseau ou de Mammifère, qui nécessite une fusion de myoblastes en un syncytium se transformant ensuite en fibre musculaire typique avec l'apparition de myofibrilles caractéristiques.

Nous avons eu recours à une technique immunochimique pour détecter les premiers signes d'apparition des protéines

¹ A. M. DUPRAT, Annls. Embryol. Morph. 3, 411 (1970).

² A. ROMANOVSKÝ et J. MÁCHA, Folia biol. 17, 387 (1971).

³ A. ROMANOVSKÝ, D. HURYCHOVÁ et J. MÁCHA, Folia biol. 19, 43 (1973).

⁴ A. SMIDOVÁ, D. HURYCHOVÁ, A. ROMANOVSKÝ et J. MÁCHA, sous presse.

⁵ A. M. DUPRAT et C. MATHIEU, C. r. Acad. Sci., Paris 277, 1705 (1973).

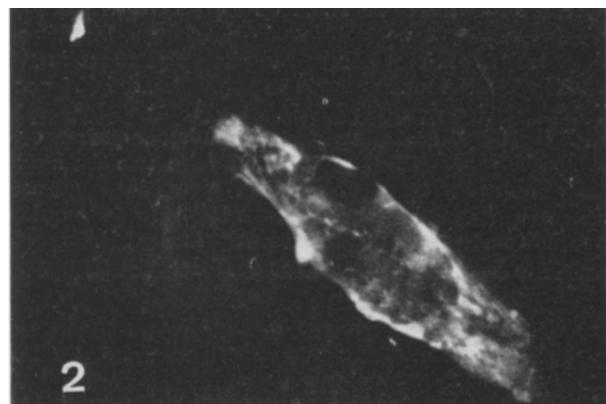
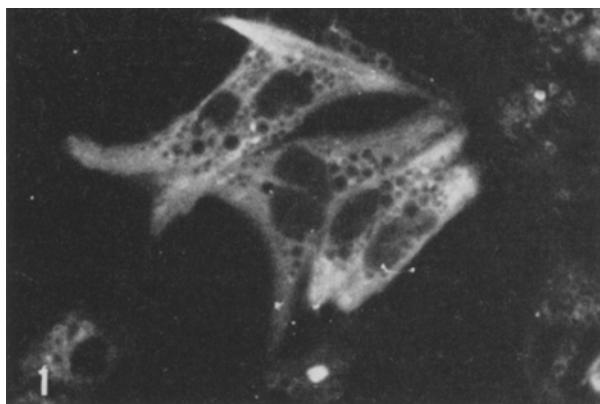


Fig. 1. et 2. Myoblastes, 4-5 jours après la mise en culture et 24 h après leur étirement. Légère fluorescence diffuse. 1. Sérum anti-myosine. 2. Sérum anti-actine.

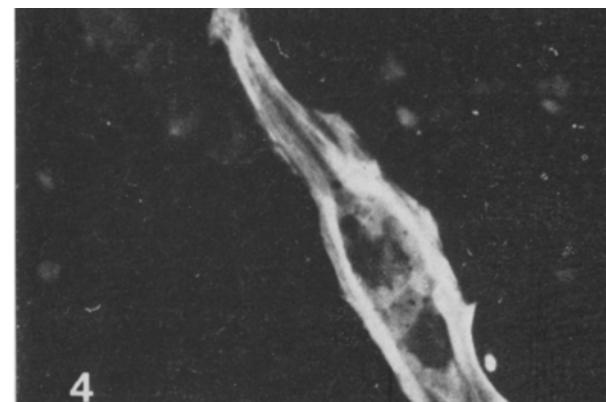
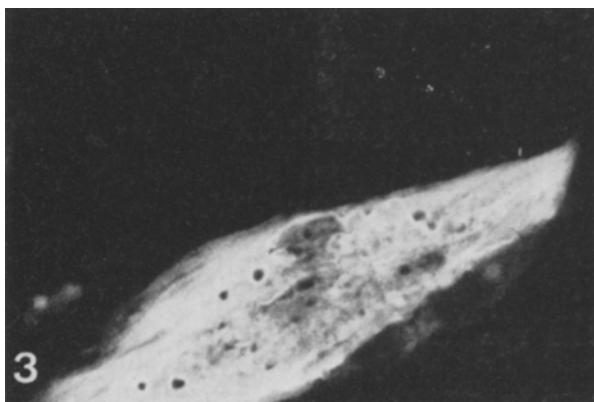


Fig. 3. et 4. Myoblastes, 7-8 jours après leur mise en culture. Importante fluorescence s'organisant en filaments, dans tout le cytoplasme. 3. Sérum anti-myosine. 4. Sérum anti-actine.

de structure des cellules musculaires, afin de savoir si ces protéines étaient déjà synthétisées bien avant que la différenciation morphologique ne se manifeste. De plus, il était intéressant de savoir si, dans ce matériel, comparativement à ce qui a déjà été observé sur d'autres (cf. ^{3, 4, 6} pour revue), deux des principales protéines contractiles (myosine et actine) apparaissent simultanément dans la cellule ou si l'apparition de l'une est retardée par rapport à celle de l'autre.

Pour ce faire des cellules ont été fixées à divers moments de leur évolution en culture: 3 jours (dès leur attachement au support), 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 11 jours.

Quel que soit l'antisérum utilisé (myosine ou actine), dès le 3^e jour après la mise en culture, on détecte par immunofluorescence un très petit nombre de myoblastes faiblement fluorescents. La majorité des cellules ne présentent pas encore de fluorescence spécifique. Par contre, au 4^e jour de culture et pendant les jours qui suivent, la fluorescence des myoblastes s'accentue (Figures 1 et 2). Cette réaction positive est d'abord diffuse, son intensité s'accroît au fur et à mesure que la cyodifférenciation progresse. (Il est à souligner qu'elle est plus marquée à la périphérie de la zone de fluorescence). Puis, la réaction positive reflète l'arrangement des protéines contractiles en myofibrilles et des filaments fluorescents non striés sont alors nettement visibles dans la plage cytoplasmique précédés vers les extrémités de la cellule, par une zone de fluorescence plus diffuse (Figures 3 et 4).

Enfin, dans des cellules musculaires nettement différenciées et très bien étalées, on peut distinguer à fort grossissement, l'alternance de zones claires et sombres le long des myofilaments, correspondant à la striation classique.

Discussion et conclusions. De la comparaison des observations effectuées grâce à la méthode d'immuno-fluorescence, sur un même système embryonnaire en différenciation *in vitro*, en utilisant soit un sérum anti-myosine, soit un sérum anti-actine, il ressort: a) que, dans le cas présent, dès leur mise en culture, les myoblastes déjà déterminés mais non encore morphologiquement différenciés, ne possèdent pas les protéines de structure nécessaires à leur cyodifférenciation (myosine et actine). b) que la synthèse de ces protéines débute au 3^e ou 4^e jours de culture c'est-à-dire peu de temps avant l'apparition de la cyodifférenciation. c) que la synthèse de ces protéines se poursuit tout au long de la différenciation des myoblastes. La fluorescence d'abord diffuse, s'organise par la suite en filaments. Cette évolution est le reflet de la synthèse puis de l'arrangement en myofilaments et myofibrilles des molécules des protéines contractiles.

Cet ensemble de résultats complète ceux précédemment obtenus sur ce même matériel à l'aide de divers inhibi-

⁶ A. ROMANOVSKÝ, D. HAYEKOVÁ et J. MÁCHA, *Folia biol.* 18, 16 (1972).

teurs de synthèses de RNA ou de protéines par l'une d'entre nous⁷ et permettent de conclure à la présence dans les myoblastes encore morphologiquement indifférenciés de RNA messagers de longue durée, qui dirigent la différenciation de ces cellules⁸.

d) Il est également important de souligner que par cette méthode il est encore possible de faire une distinction nette entre le comportement *in vitro* de myoblastes d'Oiseau (poulet)⁹ ou de Mammifère (rat)¹⁰, qui ne synthétisent pas (ou synthétisent très peu) de myosine avant la fusion des myoblastes et d'Urodèles chez qui la

⁷ A. M. DUPRAT, *Annls. Embryol. Morph.* 2, 179 (1969).

⁸ A. M. DUPRAT, A. ROMANOVSKÝ, D. HURYCHOVÁ et J. MÁCHA, *J. Embryol. exp. Morph.*, sous presse.

⁹ J. R. COLEMAN et A. W. COLEMAN, *J. Cell Biol.*, suppl. 1, 72, 19 (1968).

¹⁰ D. YAFFÉ et M. FELDMAN, *Devel. Biol.* 9, 347 (1964).

synthèse des protéines contractiles se déroule normalement dans les cellules pouvant rester isolées. e) Enfin, chez *Pleurodeles waltlii*, les deux protéines contractiles étudiées, myosine et actine, apparaissent simultanément dans les myoblastes et évoluent de façon analogue.

Summary. Myosin and actin, as studied by indirect immunofluorescence method, appear synchronously during morphological differentiation of embryonic cultivated myoblasts of *Pleurodeles waltlii*.

A. M. DUPRAT, A. ROMANOVSKÝ,
D. HURYCHOVÁ et J. MÁCHA

Laboratoire de Biologie générale, U.P.S.,
118, route de Narbonne, F-31077 Toulouse-Cedex (France),
et Katedra Obecné Zoologie, Prirodovedecké fakulty,
Vinična 7, Praha 2 (Ceskoslovensko), 27 septembre 1974.

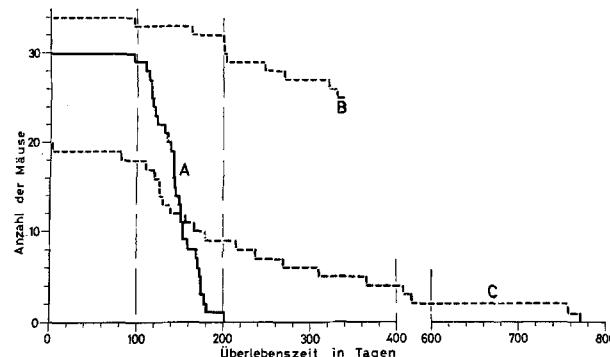
Die Bedeutung der *cis*-Aconitsäure für die biologische Inaktivierung der 3,4-Benzopyren Kanzerogenese

The Significance of the *cis*-Aconitic Acid for the Biological Inactivation of the 3,4-Benzopyrene Cancerogenesis

Experimentelle Untersuchungen über die Erzeugung von malignen Tumoren bei Tieren mit Hilfe des 3,4-Benzopyrens (3,4-BP) haben ergeben, dass die Tumorentwicklung bzw. das Tumorzachstum bei verschiedenen Tierarten sehr unterschiedlich sein kann. So zeigen junge Mäuse nach einer einmaligen s.c. Injektion von 2,52 mg 3,4-BP bereits einige Wochen danach an der Injektionsstelle kleine Verhärtungen, die später zu grösseren Tumoren wachsen (Sarkome und gelegentlich Karzinome) mit sämtlichen Malignitätsmerkmalen, wie Ulzerationen, Nekrosen, Tumormetastasen. Die Mäuse sterben zwischen 100-200 Tagen nach der 3,4-BP Injektion als Folge des malignen Prozesses. Im Gegensatz hierzu zeigen landwirtschaftliche Nutztiere wie Schweine und Rinder nach Behandlung mit höheren 3,4-BP Konzentrationen (bis 435 mg 3,4-BP) an der Injektionsstelle keinen Tumor¹. Es wurde unter anderem vermutet, dass Grossstiere unter Umständen einen Inaktivierungsmechanismus besitzen, eventuell durch

Substanzen, die in ihrem Organismus physiologisch vorkommen und in der Lage sind, die kanzerogene Wirkung des 3,4-BP abzuschwächen oder ganz zu blockieren. Gezielte Untersuchungen auf diesem Gebiet haben gezeigt, dass das Putrescin (das durch die Bakterientätigkeit im Verdauungstrakt als Dekarboxylierungsprodukt des Ornithins entsteht) die 3,4-BP Kanzerogenese bei Mäusen hemmen kann². Zusätzlich wurde die Möglichkeit geprüft, ob andere Substanzen, die als Stoffwechselprodukte im Körper höherer Organismen vorhanden sind, ähnlich wie Putrescin wirken. Bei dem Studium über die Bedeutung des Zitronensäure-Zyklus für die 3,4-BP Kanzerogenese wurde festgestellt, dass *cis*-Aconitsäure ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die 3,4-BP Tumorentwicklung bei Mäusen aufweist.

Material und Methode. 30 junge weibliche Mäuse (IMRI-Stamm, 4-5 Wochen alt, 20-25 g Körpergewicht) wurden mit 2,52 mg 3,4-BP in 0,5 ml Tricaprylin gelöst, s.c. gespritzt (Gruppe A). Gruppe B: 34 Tiere wurden ähnlich wie A behandelt + 30 mg *cis*-Aconitsäure, (d.h. *cis*-Aconitsäure wurde lokal zusammen mit 3,4-BP s.c. appliziert). Um die Löslichkeit der Säure in Tricaprylin zu steigern, wurde etwas Äthanol zugesetzt. Bei einem Vorversuch (Gruppe C, 20 Mäuse) mit 10 mg *cis*-Aconitsäure bzw. (Gruppe D, 35 Mäuse) mit <10 mg *cis*-Aconitsäure konnte eine relative hemmende Wirkung der *cis*-Aconitsäure auf die 3,4-BP Kanzerogenese festgestellt werden (Figur). Durch die Verbesserung der Löslichkeit (Zusatz von Äthanol, Gruppe B und C) und durch erhöhte Konzentration (Gruppe B) konnte die anti-kanzerogene Wirkung von *cis*-Aconitsäure auf die 3,4-BP Kanzerogenese weiter verstärkt werden (Tabelle).



Wirkung von *cis*-Aconitsäure auf die 3,4-Benzopyren Kanzerogenese. Gruppe A nur mit 2,52 mg 3,4-BP behandelte Mäuse. Die Tiere starben innerhalb von 7 Monaten durch die Tumorentwicklung. Gruppe B und C nach Zusatz von 30 mg bzw. 10 mg *cis*-Aconitsäure. Deutliche Reduzierung der 3,4-BP Kanzerogenität und Verlängerung der Überlebenszeit.

¹ G. KALLISTRATOS und A. PFAU, *Naturwissenschaften* 58, 222 (1971).

² G. KALLISTRATOS und U. KALLISTRATOS, *Naturwissenschaften* 61, 459 (1974).