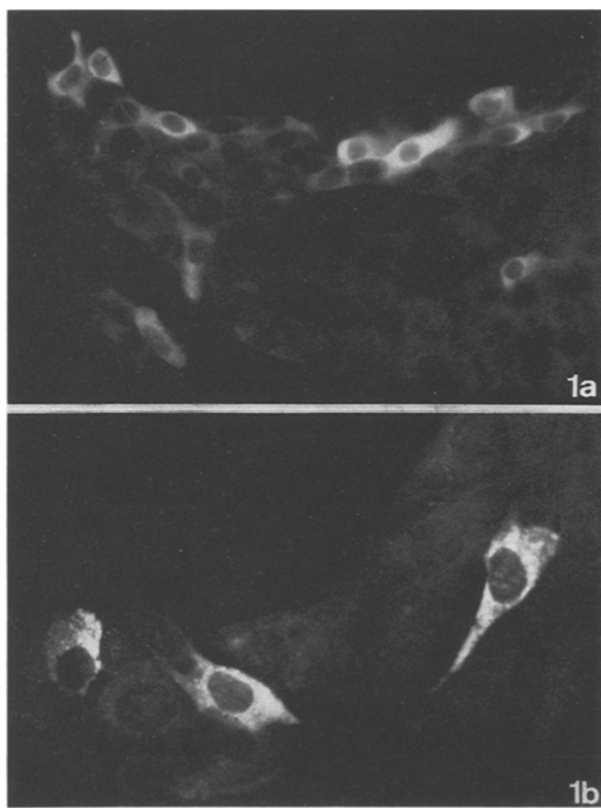




a) Three-day-old rat pancreatic monolayer culture incubated with anti-BPP serum, showing several fluorescent cells. $\times 400$. b) Same culture as in (a), at higher magnification, showing 3 positive cells. Notice that the immunofluorescent reaction is confined to the cytoplasm. $\times 680$.

(courtesy of R. E. CHANCE, Eli Lilly, Indianapolis, USA) diluted 1:10 in phosphate-buffered saline, then to a fluorescein labelled anti-rabbit γ -globulin serum (Pasteur Institute, Paris). Controls included adsorption of the specific anti-BPP serum with BPP (50 $\mu\text{g/ml}$ of undiluted serum), insulin (2 U/ml), glucagon (50 $\mu\text{g/ml}$), somatostatin (200 $\mu\text{g/ml}$), secretin (50 $\mu\text{g/ml}$), gastrin (50 $\mu\text{g/ml}$) and GLI (90 $\mu\text{g/ml}$). All Petri dishes were counterstained with 0,01% Evans' blue after incubation and observed in a Zeiss Ultraphot microscope equipped with a III RS condensor.

After exposure to anti-BPP serum, strong immunofluorescence was observed in several cells (Figure, a-b) scattered throughout the endocrine clusters. No immunofluorescent cells were observed when anti-BPP was adsorbed with BPP prior to incubation. In contrast, the staining with anti-BPP serum was not abolished by adsorption of the serum with either insulin, glucagon, somatostatin, secretin, gastrin or GLI thus excluding any cross reactivity with these polypeptides.

From these results, it appears that a specific cell population of rat pancreatic monolayer culture contain a polypeptide identical or similar to BPP. Investigations are now in progress so as to identify at the ultrastructural level the cell type reacting with anti-BPP. BPP immunoreactivity was recently found in dog pancreas and gastrointestinal tract. Fluorescent cells were particularly numerous in the uncinate process scattered through the exocrine tissue, and may correspond to the so-called F-cell¹³.

¹³ D. BAETENS, C. RUFENER and L. ORCI, *Experientia* (Abstr.) 32, 785 (1976).

Pluralité dans le déterminisme des effets tératogènes des composés organophosphorés

Plurality in the Determinism of Organophosphorus Teratogenic Effects

R. MEINIEL

Laboratoire de Biologie Animale, E.R.A., C. N.R.S. 408, Université de Clermont, Boîte postale 45, F-63170 Aubière (France), 26 janvier 1976.

Summary. In Quail embryos, nicotinamide prevents beak and legs abnormalities produced by bidrin but remains inefficient against vertebral defects induced by bidrin and parathion. In contrast, the vertebral deficiencies are greatly alleviated or abolished by pralidoxim, an antidote known and used in organophosphorus intoxications. From these observations, a plurality in the determinism of teratogenic effects induced by organophosphorus compounds is evident.

Les insecticides organophosphorés, bien connus pour leurs propriétés anticholinestérasiques¹ sont de puissants tératogènes chez l'oiseau. Ils induisent des déformations de l'axe vertébral²⁻⁴, des anomalies des membres et du bec^{5,6} et avec certains composés, comme le bidrin, toutes ces anomalies s'expriment⁷⁻¹¹. Il a été montré que les anomalies du bec et des membres – prévenues par la nicotinamide^{7-9,12} – n'étaient pas liées aux propriétés anticholinestérasiques de ces agents. Cependant malgré des observations préliminaires^{11,13} aucune preuve formelle n'est venue à ce jour démontrer que les organophosphorés agissaient sur la morphogénèse vertébrale par l'intermédiaire d'un mécanisme spécifique. En relation avec ce problème, nous exposerons ici les résultats d'expériences ayant consisté à injecter, simultanément à deux insecticides organophosphorés (le parathion et le

bidrin), de la pralidoxime, molécule connue et employée en clinique pour ses propriétés réactivatrices des cholinestérasas phosphorylées^{14,15}. Les effets de la pralidoxime seront comparés à ceux obtenus après l'emploi de la nicotinamide.

Matériel et techniques. Les œufs de caille (*Coturnix coturnix japonica*) utilisés sont issus de l'élevage du laboratoire. Les traitements tératogènes sont appliqués avant la mise en incubation des œufs. Le parathion purifié à 96,3% (Rhône-Poulenc) est dissous dans l'huile d'olive et injecté à raison de 75 μg par œuf. Le bidrin (dicrotophos; isomère *cis*-crotonamide), purifié à 85,8% (Schell) est dissous dans du soluté physiologique et chaque œuf reçoit 0,25 mg de ce composé. Les contretraitements sont réalisés au 3^e jour de l'incubation. La pralidoxime (sulfométhylate d'hydroxyiminométhyl-2

Tableau I. Résultats d'expériences réalisées avec le parathion seul ou combiné à la pralidoxime ou à la nicotinamide

Expériences	Nombre d'œufs		Nombre d'embryons survivants au 11 ^e jour (% mortalité)	Malformations *					
	Injectés	Fécondés		Epine dorsale			Bec et membres		
				+++	++	± 0	+++	++	± 0
Parathion (75 µg)	100	90	76 (15,55%)	76					76
Parathion 75 µg + pralidoxime 2 mg (8,06 µM)	200	186	57 (69,35%)		5	52			57
Parathion 75 µg + nicotinamide 1 mg (8,11 µM)	130	105	43 (59,04%)	43					43

Tableau II. Résultats d'expériences réalisées avec le bidrin seul ou combiné à la pralidoxime ou à la nicotinamide

Expériences	Nombre d'œufs		Nombre d'embryons survivants au 11 ^e jour (% mortalité)	Malformations *					
	Injectés	Fécondés		Epine dorsale			Bec et membres		
				+++	++	± ±	+++	++	± 0
Bidrin 0,25 mg	75	62	46 (25,80%)	39	4	3	45		1
Bidrin 0,25 mg + pralidoxime 2 mg (8,06 µM)	200	164	61 (62,80%)		18	43	58	3	
Bidrin 0,25 mg + nicotinamide 1 mg (8,11 µM)	100	87	36 (58,62%)	29	7				36

* Le nombre de signes + est proportionnel au degré de gravité des malformations.

méthyl-1 pyridinium) est utilisée sous sa forme commercialisée (Contrathion®-Spécia); chaque œuf en reçoit 2 mg, soit 8,06 µmoles. La nicotinamide (Merck) est injectée à la dose de 1 mg (8,11 µmoles). Toutes les injections sont réalisées dans le sac vitellin. L'incubation est effectuée à une température constante de 38°C, et les embryons sont sacrifiés au 11^e jour.

Résultats. Les traitements au parathion (Tableau I) engendrent des anomalies vertébrales – associations de lordoses et de cyphoses très accentuées au niveau du cou – dans 100% des cas et leur gravité est voisine de celle observée antérieurement¹³. Le bec et les pattes ont toujours une morphologie normale.

L'association de pralidoxime et de parathion réduit la gravité ou supprime totalement l'apparition des anomalies axiales. La nicotinamide reste sans effet lorsqu'elle est injectée chez des sujets exposés au parathion; ni la fréquence ni la gravité des anomalies ne se trouvent alors modifiées.

Avec le bidrin (Tableau II), les anomalies axiales apparaissent avec une fréquence très élevée mais elles sont parfois moins accentuées qu'avec le parathion malgré les fortes doses de produit employées. Avec cet insecticide, on assiste également à des développements aberrants aux niveaux du bec et des pattes. L'hémi-bec supérieur est recourbé et/ou fortement brachygnathe. La brachygnathie étant régulièrement présente au niveau de l'hémi-bec inférieur. Les membres sont toujours micromèles.

Les embryons soumis au double traitement bidrin + pralidoxime présentent dans tous les cas un allongement des territoires axiaux, plus particulièrement net au niveau cervical. Dans les mêmes conditions, les anomalies du bec et des pattes demeurent évidentes. Inversement, la

nicotinamide prévient les déformations du bec et des membres induites par le bidrin sans exercer le moindre effet sur les structures axiales.

Discussion. Des récents résultats de PROCTOR et CASIDA¹⁸, il ressort que les traitements tératogènes au bidrin ou à l'ésérine provoquent une chute importante du taux embryonnaire de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) et que l'adjonction de nicotinamide, tout en prévenant les anomalies du bec et des membres, restaure la concentration de NAD à un niveau normal. Nos résultats, obtenus lors des doubles traitements bidrin + nicotinamide, montrent également, chez la caille, la

¹ B. HOLMSTEDT, in *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents* (Ed. G. B. KOELLE; Springer, Berlin 1963), chapt. 9, p. 428.

² K. S. KHERA and S. BEDOK, *Food Cosmet. Toxic.* 5, 359 (1967).

³ R. MEINIEL, H. LUTZ and Y. LUTZ-OSTERTAG, *Archs Anat. microsc. Morph. exp.* 59, 167 (1970).

⁴ R. MEINIEL, Thèse Doctorat Etat, A.O. CNRS. 11974 (1975).

⁵ M. HO and M. A. GIBSON, *Can. J. Zool.* 50, 771 (1972).

⁶ J. GREENBERG and Q. N. LA HAM, *Can. J. Zool.* 47, 539 (1969).

⁷ J. C. ROGER, H. CHAMBERS and J. E. CASIDA, *Science* 144, 539 (1964).

⁸ D. G. UPSHALL, J. C. ROGER and J. E. CASIDA, *Biochem. Pharmac.* 17, 1529 (1968).

⁹ J. C. ROGER, D. G. UPSHALL and J. E. CASIDA, *Biochem. Pharmac.* 18, 373 (1969).

¹⁰ W. LANDAUER and N. SALAM, *Devel. Biol.* 28, 35 (1972).

¹¹ R. MEINIEL, C. r. Acad. Sci., Paris 280, série D, 1019 (1975).

¹² J. GREENBERG and Q. N. LA HAM, *Can. J. Zool.* 48, 1047 (1970).

¹³ R. MEINIEL, C. r. Acad. Sci., Paris 279, 603 (1974).

¹⁴ F. HOBBERGER, in *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents* (Ed. G. B. KOELLE; Springer, Berlin 1963), chapt. 21, p. 921.

¹⁵ I. L. NATOFF, *Progr. med. Chem.* 8, 1 (1971).

¹⁶ N. H. PROCTOR and J. E. CASIDA, *Science* 190, 580 (1975).

relation entre la non expression des anomalies du bec et des pattes induites par le bidrin et l'apport de nicotinamide. Toutefois, dans nos expériences, que ce soit avec le parathion ou le bidrin, la nicotinamide n'a révélé aucun effet antitératogène au niveau des structures vertébrales et il en est de même chez l'embryon de poulet⁴. A l'inverse, après emploi de la pralidoxime, les anomalies axiales (parathion et bidrin) sont très atténuées ou absentes alors que les déformations du bec et des membres (bidrin) demeurent pratiquement inchangées, du moins sur le plan phénotypique. Ces faits traduisent l'existence d'une pluralité dans le déterminisme des effets tératogènes induits par les organophosphorés.

Etant donné d'une part, les propriétés pharmacologiques respectives des esters phosphoriques et de la pralidoxime sur la jonction neuro-musculaire^{1,14,15} et

d'autre part, les effets tératogènes observés après des injections tardives de parathion^{4,17}, il est probable que les déformations de l'axe vertébral observées après des traitements aux organophosphorés sont en rapport avec une modification profonde de la physiologie du système cholinergique. Cette interprétation est étayée par les résultats obtenus avec la toxine botulique¹⁸ et divers cholinomimétiques^{19,20} qui engendrent également des anomalies de l'axe vertébral.

¹⁷ R. MEINIEL, C. r. Soc. Biol., Paris 167, 459 (1973).

¹⁸ P. D. F. MURRAY and D. B. DRACHMAN, J. Embryol. exp. Morph. 22, 349 (1969).

¹⁹ E. D. BUEKER and W. S. PLATNER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 91, 539 (1956).

²⁰ W. LANDAUER, Teratology 12, 125 (1975).

Elektronenmikroskopisch-cytochemische Untersuchungen an glycerinierter Flugmuskulatur von *Locusta migratoria* L. Die Eisencolloidreaktion und Alcianblaubindung

Electron Cytochemical Studies on Glycerinated Flight Muscle of *Locusta migratoria* L. The Colloidal Iron Reaction and Alcian Blue Binding

K. ALLMANN¹

Fachbereich Biologie der Universität Konstanz, Postfach 7733, D-775 Konstanz (Bundesrepublik Deutschland, BRD), 27. Dezember 1975.

Summary. Structural material reacting with colloidal iron and, particularly, after deamination binding with Alcian blue, can be demonstrated by means of the electron microscope in the sarcomeres of glycerinated locust flight muscle, especially in the I-bands. These metal bindings are eliminated by blocking reactions for acidic anionic groups, but not by hydrolytic enzymes.

In einer früheren elektronenmikroskopischen Untersuchung über die Eisen-III-Bindung in glycerinierter und myosinextrahierter, aldehydfixierter Flugmuskulatur von *Locusta migratoria* L. wurde unter Verwendung von Ammoniumeisen-III-sulfat als Ferridonator in den Flugmuskel-I-Bändern ferriphiles Strukturmaterial nachgewiesen². Inzwischen wurden in Säuger-, Frosch- und Fischmuskulatur Strukturmaterial vom Proteoglykantyp³ und in Insektenflugmuskel-I-Bändern und Z-Scheiben «C»-Filamente bzw. Strukturmaterial noch nicht bekannter Zusammensetzung identifiziert⁴. Im Hinblick auf diese Befunde wurde eine elektronenmikroskopische Charakterisierung des ferriphilen Strukturmaterials in *Locusta*-Flugmuskulatur mit Hilfe von Metallbindungs- und Spezifizierungsreaktionen versucht.

Material und Methode. Teile von Fibrillenfragmentpräparationen³ und Kryostatschnitte von kurz- und langglycerinierter indirekter *Locusta*-Flugmuskulatur wurden nach Aldehydfixierung mit Eisencolloidreagenz (Ammoniumferriglycerat)⁵ oder mit 0,1%- bzw. 1%-Alcianblau 8GX⁶ in 0,025 M Acetatpuffer, pH 4,6, ohne und mit MgCl₂-Zusätzen (in 0,2 M-Stufen bis zu einer Molarität von 1,0 M MgCl₂) nach der Methode der «Critical Electrolyte Concentration (CEC)» behandelt⁷. Als Aldehydfixative dienten 2,5%-Glutaraldehyd bzw. 4%-Formaldehyd in 0,1 M Phosphat- oder Cacodylatpuffer, pH 7,2, für die AB-Bindung auch in 0,025 M Acetatpuffer, pH 4,6 (Fixierungszeiten: 30 min und 2 h). Die AB-Inkubation wurde daneben noch gleichzeitig mit der Glutaraldehydfixierung vorgenommen⁸, ferner auch mit der Formolfixierung (obige Fixative, 0,1 bzw. 1% an AB-8GX). Zur Spezifizierung der für die Eisen- bzw. Cu-Phthalocyanin-Bindung verantwortlichen elektronega-

tiven Gruppen von Gewebepolyanionen wurden Teile des (ohne AB-Zusatz) fixierten Muskelmaterials folgenden Behandlungen zur Eliminierung der Metallbindung unterworfen: Blockierung der sauren Gruppen durch Methylierung (Veresterung⁹ und Alkylierung^{10,11}) und Cetylpyridiniumchlorid-Behandlung¹²; Inkubationen mit

¹ Fräulein E. WELCKER danke ich für die fototechnischen Arbeiten und Frau P. ALLMANN für die Betreuung der Insektenzucht.

² K. ALLMANN, Cytobiologie 3, 282 (1971).

³ W. J. DOUGHERTY, J. Histochem. Cytochem. 17, 36 (1969). – W. J. DOUGHERTY und M. M. LEE, J. Ultrastruct. Res. 31, 1 (1970).

⁴ J. AUBER und F. COUTEUX, J. Microsc. 2, 309 (1963). – N. GARAMVÖLGYI, J. Ultrastruct. Res. 13, 409 (1963). – K. TROMBITÁS und A. TIGYI-SEBES, Acta biochim. biophys. hung. 9, 243 (1974) und 10, 83 (1975). – J. D. SAIDE und W. C. ULLRICK, J. molec. Biol. 79, 329 (1973) und 87, 671 (1974).

⁵ J. F. RINEHART und S. K. ABUL HAJ, Arch. Path. 52, 189 (1951). – J. H. HARDIN und S. S. SPICER, J. Cell Biol. 48, 368 (1971).

⁶ Alcian Blue 8GX = AB.

⁷ H. F. STEEDMAN, Q. Jl microsc. Sci. 91, 477 (1950). – J. E. SCOTT und J. DORLING, Histochemie 5, 221 (1965). – G. STERBA und G. WOLF, Histochemie 17, 57 (1969). – J. E. SCOTT, Histochemie 32, 191 (1972).

⁸ O. BEHNKE und T. ZELANDER, J. Ultrastruct. Res. 31, 424 (1970).

⁹ E. R. FISHER und R. D. LILLIE, J. Histochem. Cytochem. 2, 81 (1954).

¹⁰ J. Y. TERNER, J. Histochem. Cytochem. 12, 504 (1964).

¹¹ G. GEYER, Acta histochem. 14, 284 (1962).

¹² G. QUINTARELLI, J. E. SCOTT und M. C. DELLOVO, Histochemie 4, 86 (1964). – J. E. SCOTT und J. DORLING, Histochemie 5, 221 (1965).