

succumbed to endotoxin challenge. Even with an endotoxin challenge dose of 25 µg, pretreatment with poly I:C inhibited complete protection by hydrocortisone.

**Discussion.** Endotoxin and poly I:C elicit synthesis and/or release of potent biologically active mediators. Three of these mediators are interferon<sup>7,8</sup>, colony stimulating factor<sup>21</sup>, and tumor necrosis factor<sup>5</sup>. A fourth mediator, endogenous pyrogen, is also probably released in response to poly I:C, as it is in response to endotoxin, since both substances are pyrogenic in rabbits<sup>3</sup>. Results presented in this report imply that poly I:C also stimulates production of GAF, the inhibitor of PEPCK induction in endotoxemic mice<sup>16</sup>.

The observation that poly I:C pretreatment inhibits hormonal protection of mice challenged with endotoxin may have direct bearing on the nature of irreversible endotoxemic shock. Corticosteroids protect mice from endotoxic lethality only when administered prior to or

concurrently with a lethal dose of the toxin. If hormone is withheld, the animal rapidly enters a state of irreversible shock in which a delayed injection of hormone is no longer protective<sup>22</sup>. Pretreatment with poly I:C appears to simulate this condition. These mice display antagonized protective responses to hormone therapy upon endotoxin challenge at a time following pretreatment when PEPCK and TO<sup>10</sup> are no longer responsive to hormonal induction. Failure of these two enzymes to respond to corticosteroid induction is most probably representative of metabolic derangements contributing to this increased susceptibility to endotoxin lethality.

<sup>21</sup> F. W. RUSCETTI and P. A. CHEWENICK, J. Lab. clin. Med. 83, 64 (1974).

<sup>22</sup> L. J. BERRY in *Microbiological Toxins V* (Eds. S. KADIS, G. WEINBAUM and S. AJL; Academic Press, New York 1971), p. 165.

## Effets de la concanavaline A sur la morphologie et le comportement de cellules embryonnaires d'Urodèles en différenciation in vitro

### Morphological Effects of Concanavalin A on Amphibian Embryonic Cells Differentiating in vitro

J.-P. LAMON et ANNE-MARIE DUPRAT<sup>1</sup>

Laboratoire de Biologie générale, Université Paul-Sabatier, 118, route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex (France), 3 juin 1976.

**Summary.** Concanavalin A exerts an irreversible inhibitory effect on the differentiation of cultured embryonic amphibians cells in vitro. Cytological changes and disturbances of cell attachment, and spreading to the culture support occur in parallel. Polykaryons have been noticed in treated cultures.

La concanavaline A, glycoprotéine végétale, possède, outre ses propriétés hémagglutinantes<sup>2</sup>, celle de provoquer des fusions cellulaires (cellules embryonnaires de Drosophile<sup>3,4</sup>).

Les effets de la concanavaline A (Con A) ont été étudiés sur des embryons d'Amphibiens in toto par MORAN<sup>5</sup> qui a constaté une inhibition dans le développement chez *Ambystoma maculatum*. D'autres expériences de O'DELL et coll.<sup>6</sup> sur l'Amphibiens Anoure *Xenopus laevis* ont également montré une inhibition du développement du tube nerveux.

Le but de ce travail est d'analyser à un niveau cellulaire les effets morphologiques de la Con A, d'une part sur la différenciation de diverses catégories de cellules embryonnaires d'Amphibiens cultivées in vitro et, d'autre part,

sur divers organites, tant nucléaires que cytoplasmiques. Les cellules d'Amphibiens Urodèles se prêtent bien à ce genre d'étude par leur taille, la bonne visibilité des divers organites qu'elles renferment et leur comportement in vitro<sup>7</sup>. Il était également intéressant de vérifier si les cellules embryonnaires de Batraciens réagissent vis-à-vis de la Con A d'une manière comparable à celle des cellules embryonnaires de Drosophile en formant des polycaryons.

**Matériel et méthodes.** Les embryons utilisés proviennent de pontes de *Pleurodeles waltlii* (Michah) et d'*Ambystoma mexicanum* (Shaw). Au stade neurula (stade 14 de la table chronologique de GALLIEN et DUROCHER<sup>8</sup>, la plaque neurale associée au chondromésoblaste sous-jacent est prélevée, dissociée dans le milieu de Steinberg<sup>7</sup>. Les cellules sont ensuite cultivées à 18°C, dans la solution de

Tableau 1. Nombre de populations de 125 cellules par type de traitement et par effectif de polycaryons (avec proportion et proportion transformée des polycaryons)

Nombre de polycaryons par population (125)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Proportion correspondant à ce nombre: $p^a$	0,008	0,016	0,024	0,032	0,040	0,048	0,056	0,064	0,072	0,080
$p$ transformée en $x = 57,3 \sqrt[p]{p}$	5,125	7,247	8,877	10,250	11,460	12,554	13,560	14,496	15,375	16,207
Témoins (1)	4	4	1							
Nombre de populations présentant $p$ par type de traitement	Jusqu'au changement (2)	2	6	7	4	1				
	Après le changement (3)	7	11	9	1	1	1			
	Traitement continu (4)			1	1	3	3	2	1	1

<sup>a</sup> Exemple: il y a 4 populations de 125 cellules qui présentent 5 polycaryons dans le traitement 2 (jusqu'au changement de milieu).  $p = 5/125 = 0,040$ ;  $x = 57,3 \sqrt[5]{0,040} = 11,460$ .

BARTH<sup>9</sup> additionnée d'antibiotiques et de sérum-albumine bovine (1 dg/100 ml), avec ou sans Con A. Leur étalement nécessite 3 jours; il est alors nécessaire de procéder à un changement de milieu en utilisant de la solution de Barth, toujours pourvue d'antibiotiques avec ou sans Con A. Les observations au contraste de phase sont poursuivies durant 3 semaines à partir de la mise en culture.

Dans une série d'expériences préliminaires, les seuils d'activité et de toxicité de la Con A ont été déterminés. Nous avons constaté que pour un traitement continu, le seuil d'activité est de 1 µg/ml, le seuil de toxicité 25 µg/ml (pour 8 jours de survie).

Plusieurs types de traitements ont été réalisés avec une gamme de concentrations en Con A allant de 100 µg à 1 µg/ml. Dans un premier type de traitement, les cellules sont maintenues en présence de Con A pendant toute la durée de la culture. Dans un deuxième type de traitement, les cellules sont placées dans le milieu traitant dès la mise en culture et jusqu'au changement de milieu seulement. Dans un troisième type, le traitement ne débute qu'après l'attachement et l'étalement des cellules sur le support, soit lors du changement de milieu.

Pour l'analyse statistique, les cultures de cellules témoins et traitées sont tirées au hasard au moyen d'une table de nombres casualisés<sup>10</sup>. Nous avons divisé les cultures en populations de 125 cellules et calculé sur ce nombre la proportion de cellules pluri-nucléées. La variable étant une proportion et celle-ci n'atteignant en général

qu'une valeur faible nous avons effectué la transformation angulaire suivante:

$$x = 57,3 \sqrt{p} \text{ où } p = \frac{\text{nombre de cellules pluri-nucléées}}{125} \text{ et}$$

$$57,3 \approx 57,295 \approx \frac{180^\circ}{\pi}.$$

**Résultats.** *Evolution des cellules témoins.* Lors de la mise en culture, les cellules sont sphériques et chargées de vitellus. Elles adhèrent au fond de la chambre de culture et s'y étalent au bout de 3 à 4 jours. C'est au cinquième jour que la différenciation morphologique débute. Les neuroblastes émettent des axones qui s'allongent

<sup>1</sup> Les auteurs remercient le Prof. L. Bonnet de ses précieux conseils pour l'analyse statistique des résultats, ainsi que le Prof. J. C. Beetschen pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

<sup>2</sup> N. SHARON et H. LIZ, Science 177, 949 (1972).

<sup>3</sup> J. L. BECKER, C. r. Acad. Sci. Paris 275, série D, 2969 (1972).

<sup>4</sup> G. ÉCHALIER, Rencontre de Luminy, 9 et 10 mai 1975: «Aspects moléculaires de la différenciation et du développement.»

<sup>5</sup> D. MORAN, J. exp. Zool. 188, 361 (1974).

<sup>6</sup> D. S. O'DELL, R. TENCER, A. MONROY et J. BRACHET, Cell Differ. 3, 73 (1974).

<sup>7</sup> A. M. DUPRAT, Ann. Embryol. morph. 3, 411 (1970).

<sup>8</sup> L. GALLIEN et M. DUROCHER, Bull. Biol. Fr. Belg. 91, 97 (1957).

<sup>9</sup> L. G. BARTH et L. J. BARTH, Embryol. exp. Morph. 7, 210 (1959).

<sup>10</sup> LISON, dans *Statistique appliquée à la Biologie expérimentale* (Ed. Gauthier Villars, Paris 1968).

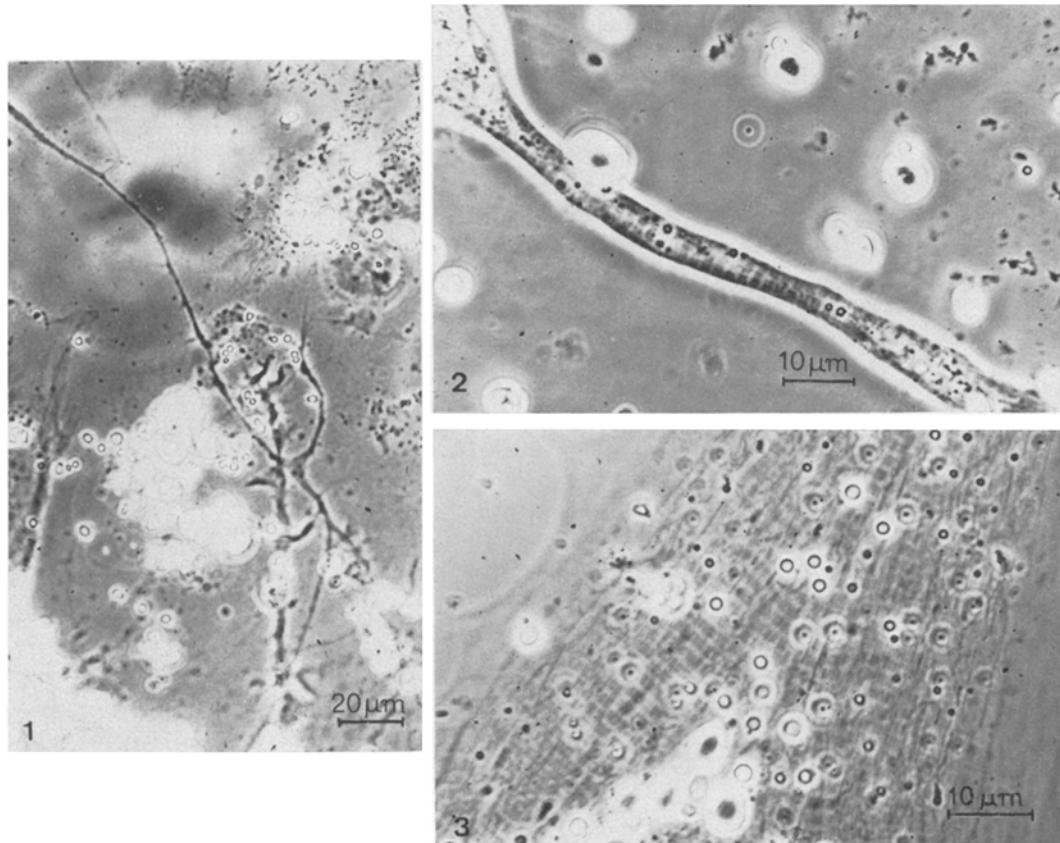


Fig. 1. Région axonique d'un neurone traité à la Concanavaline A (25 µg/ml): axone non rectiligne avec d'importants filopodes latéraux et de nombreuses bifurcations terminales.

Fig. 2. Myoblaste traité présentant une plage cytoplasmique très étroite où l'on observe cependant des myofibrilles caractéristiques.

Fig. 3. Cellule musculaire témoin.

Tableau 2. Analyse de variance pour les quatre séries de traitements prises deux par deux et pour l'ensemble des 4 séries

Analyse de variance pour:	Source de variation*	Déviance	Degrés de liberté	Variance	F	Seuils 5%	1%	Conclusion
Témoins (1) et traités (2)	a	63,470	1	63,470	20,393	4,21	7,68	+
	b	84,032	27	3,112				
Témoins (1) et traités (3)	a	53,825	1	53,825	22,519	4,105	7,37	+
	b	88,438	37	2,390				
Témoins (1) et traités (4)	a	292,447	1	292,447	96,317	4,54	8,68	++
	b	45,545	15	3,0363				
Traités (3) et traités (2)	a	2,0113	1	2,0113	0,682	252	6,302	-
	b	141,566	48	2,949				
Traités (2) et traités (4)	a	102,824	1	102,824	31,262	4,17	7,56	+
	b	98,673	30	3,289				
Traités (3) et traités (4)	a	144,941	1	144,941	56,245	4,08	7,31	+
	b	103,079	40	2,577				
Traitements (1-4)	a	241,152	3	87,051	31,636	3,985	7,03	+
	b	187,111	68	2,752				

«F» est le rapport des variances de chaque cas (9). \*Chaque série comporte un nombre variable de populations; l'homogénéité de chacune d'elles a été vérifiée par rapport aux autres. a: variation entre les séries; b: variation dans les séries. +, Différences significatives; -, différences non significatives.

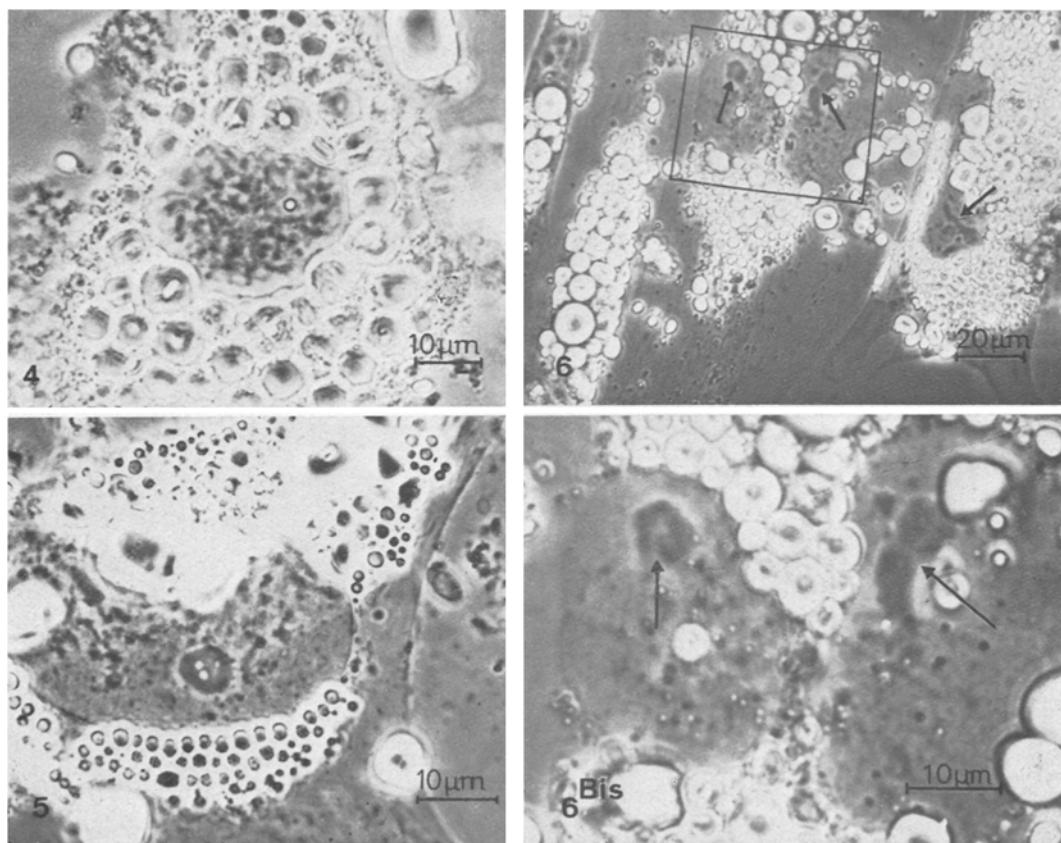


Fig. 4-6. Anomalies nucléaires apparues sous l'action de la Concanavaline A. Fig. 4: Noyau présentant l'aspect d'un début de prophase. Fig. 5: Vacuolisation nucléolaire. Fig. 6: Nombreuses fusions nucléolaires (→). Fig. 6 Bis.

progressivement pendant les jours qui suivent. Les myofibrilles apparaissent dans les myoblastes, d'abord près du noyau puis gagnent les extrémités de la cellule. Les mélanoblastes se chargent très rapidement de grains de pigment et les cellules de type épithelial et fibroblastique s'étalent en émettant des pseudopodes plus ou moins importants. Des mitoses sont surtout observées dans ces dernières catégories de cellules.

*Comportement des cellules traitées.* 1. Nous avons observé, lors du traitement continu, a) une adhésion massive des cellules au support dans les 20 à 60 min qui suivent la mise en culture; une *agglutination cellulaire* rapide et la formation d'agrégats plus ou moins importants. L'attachement au support tend à diminuer ensuite, alors que les cellules témoins présentent l'adhésion maximale (3-4 jours de culture). b) 24 à 72 h de retard dans la différenciation des cellules traitées qui restent attachées au support. Les neuroblastes se révèlent très sensibles à la Con A bien que la formation d'axones très perturbée ne soit pas totalement inhibée (fig. 1). Les myoblastes présentent un degré moindre de sensibilité, toutefois les myofibrilles sont moins apparentes que chez les témoins

et la plage cytoplasmique de ces cellules ne s'accroît pas (fig. 2 et 3). Enfin, les mélanoblastes et les cellules épithéliales semblent peu sensibles à la Con A, bien qu'elles présentent quelques signes de rétraction cellulaire (fig. 8 et 9). c) *Des effets cytologiques* dans tous les types cellulaires. Dans le noyau: condensation de la chromatine donnant parfois des figures comparables à des prophases (fig. 4), vacuolisations des nucléoles (fig. 5), nombreuses fusions nucléolaires (fig. 6). Dans le cytoplasme: résorption des réserves vitellines ralenti, par contre, morphologie des mitochondries normale. Les rétractions cellulaires sont nombreuses, l'agrégation intercellulaire est toujours très forte.

2. Lors du traitement interrompu au 3<sup>e</sup> jour après la mise en culture, le retard de l'étalement est plus ou moins prononcé selon la concentration en Con A. Cependant, la tendance à l'agrégation persiste, il se forme des groupes de 2, 3 ou 4 cellules et dans certains cas, la membrane cytoplasmique n'est plus apparente entre ces cellules (fig. 7). La réversibilité de la rétraction cellulaire est nette, les altérations morphologiques se manifestent quand même, (axones).

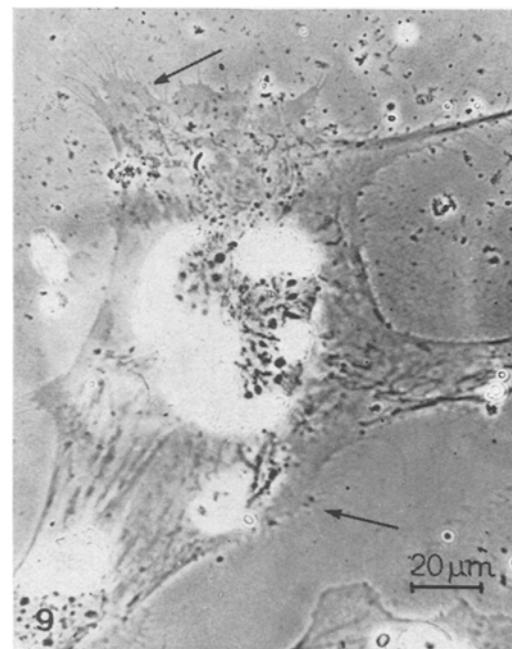
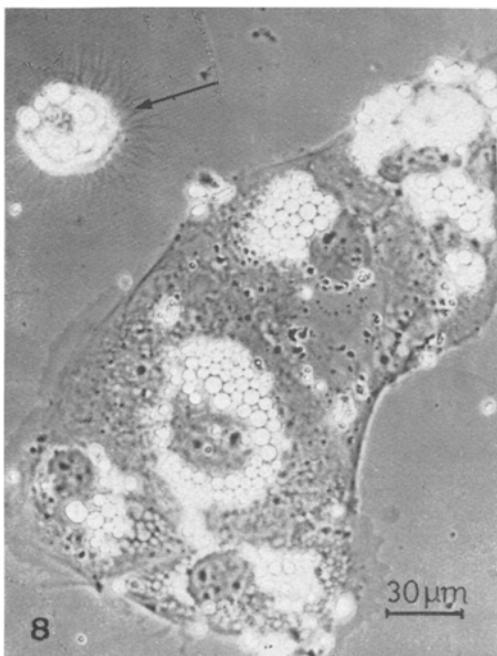
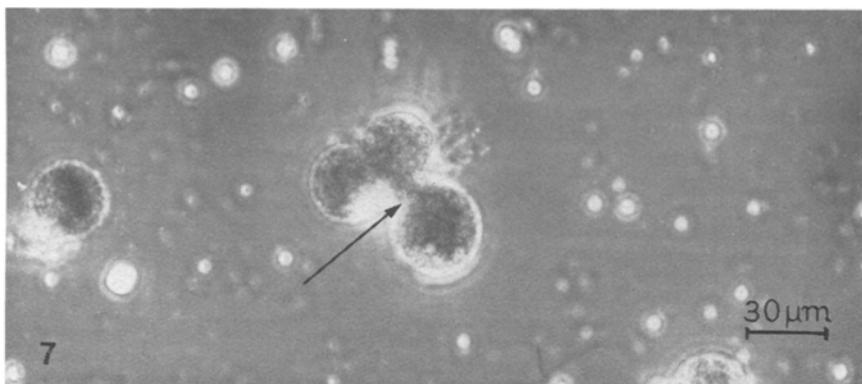


Fig. 7. Agrégat de 3 cellules non étalées dont 2 présentent une continuité cytoplasmique nettement soulignée par la continuité de leurs réserves vitellines (→).

Fig. 8 et 9. Polycaryons formés par suite du traitement à la concanavaline A (20 µg/ml). Rétraction cytoplasmique plus ou moins marquée (→).

3. Lorsque le traitement à la Con A débute après l'attachement et l'étalement cellulaire, peu de détachements se produisent, toutefois des rétractions cytoplasmiques plus ou moins prononcées sont observées.

4. Nous avons noté parmi les cellules étalées des cultures traitées un plus grand nombre de polycaryons que dans les cultures témoins (fig. 8, 9). Un traitement préalable à la trypsine<sup>2,11</sup> n'a pas particulièrement favorisé l'accentuation de ce phénomène.

*Analyse statistique.* Nous avons noté parmi les cellules étalées des cultures traitées, un plus grand nombre de polycaryons que dans les cultures témoins. Compte tenu du faible pourcentage de ces cellules dans les deux cas, un recours à une étude statistique a été nécessaire, afin de déterminer si le traitement à la Con A avait un effet éventuel sur la formation de polycaryons dans le système étudié.

L'analyse de variance concernant les cellules témoins et traitées montre une grande homogénéité à l'intérieur des séries de traitement et des différences hautement significatives entre ces séries (tableaux 1 et 2).

*Discussion, conclusion.* Nous avons, par ce travail, abordé les effets morphologiques de la Con A au niveau de la cellule isolée. Nous avons ainsi constaté que:

— La Con A a une action sur la différenciation cellulaire puisqu'elle perturbe la différenciation des neurones et, à un degré moindre, celle des myoblastes et des autres catégories de cellules cultivées. Nous retrouvons donc au niveau cellulaire, les effets inhibiteurs décrits par d'autres auteurs<sup>5,6,13</sup> sur l'embryon *in toto*. Notons que cette action, sans doute indirecte, montre le lien étroit qui existe entre les différents «compartiments» cellulaires, membrane cellulaire, cytoplasme et noyau, puisque une action au niveau de la membrane se répercute aussi bien sur le cytoplasme que sur le noyau.

— La Con A entraîne des modifications des organites nucléaires, altérations nucléolaires (vacuolisation, fusion) et chromatiniennes (condensation) et un ralentissement du métabolisme cellulaire.

— L'action de la Con A sur la membrane cellulaire<sup>12</sup> se traduit ici, par une perturbation de l'adhésivité des cellules au support de culture.

— La Con A provoque dans les cellules d'Amphibiens la formation de polycaryons. Une analyse statistique conclut à un effet positif de cette protéine sur leur formation. Dans l'état actuel de nos recherches, il ne nous est pas possible de dire si ces polycaryons sont des hybrides cellulaires ou le résultat d'aberrations mitotiques dues à la présence de la lectine dans le milieu de culture. Il faut cependant noter que leur taux dans les cellules traitées (environ 5%) est du même ordre que celui des hétérocaryons obtenus chez la Drosophile<sup>4</sup>. La présence de polycaryons dans les cultures témoins (2%) pourrait être attribuée entre autres facteurs, à l'emploi de l'E.D.T.A. comme agent de dissociation des explants (TENCER, communication personnelle).

Ainsi donc, les effets de la Con A sur la morphogenèse de l'embryon d'amphibiens, ne s'exercent pas seulement sur un organisme déjà complexe<sup>13</sup> mais se retrouvent au niveau cellulaire. Les résultats de nos expériences soulignent une fois de plus l'interdépendance étroite qui existe à ce niveau entre membrane cellulaire, cytoplasme et noyau.

<sup>11</sup> C. SATO et K. TAKASAWA-NISHIZAWA, *Exp. Cell Res.* 89, 121 (1974).

<sup>12</sup> Y. MORI, H. AKEDO et Y. TANIGAKI, *Exp. Cell Res.* 78, 360 (1973).

<sup>13</sup> D. MORAN, *Exp. Cell Res.* 86, 365 (1974).

## Arabinose Nucleoside Triphosphates are no Inhibitors for DNA-Dependent RNA Polymerases

W. E. G. MÜLLER

*Institut für Physiologische Chemie, Universität Mainz, Johann-Joachim-Becher-Weg 13, D-65 Mainz (Federal Republic of Germany, BRD), 21 July 1976.*

**Summary.** 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine-5'-triphosphate and 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyladenosine-5'-triphosphate were found to have no inhibitory potency for both mammalian DNA-dependent RNA polymerase II and *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase.

It is well established that 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine-5'-triphosphate (ara-CTP) and 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyladenosine-5'-triphosphate (ara-ATP) inhibit DNA-dependent DNA polymerases from eukaryotic cells<sup>1-4</sup>. Ara-CTP has been shown not to inhibit mammalian RNA polymerases<sup>1</sup>; ara-ATP does not inhibit DNA-dependent RNA polymerases I and II from quail oviduct<sup>4</sup> and this compound exerts also no effect on bacterial RNA polymerase<sup>3</sup>. However, in a recent study<sup>5</sup> it was published that the 2 arabinose-compounds inhibit both DNA-dependent RNA polymerase II, isolated from chicken leukaemic cells and DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli*. It is the aim of this note to clarify this obvious discrepancy.

The following enzymes were used: 1. DNA-dependent RNA polymerase II from quail oviduct with a specific activity of 7.6 nmoles [ $^3$ H] ATP per mg protein and 20 min<sup>6</sup>; 2., DNA-dependent RNA polymerase from Rous Sarcoma Virus induced sarcoma of the breast muscle of

quails<sup>7</sup> isolated by the same procedure<sup>6</sup>, the specific activity was 10.4 nmoles [ $^3$ H] ATP per mg protein and 20 min; and 3., DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli*<sup>8</sup> purchased from Miles, Kankakee (USA). Ara-CTP and ara-ATP came from Terra-Marine Bioresearch, La Jolla (USA); chromatographically pure ara-CTP was a gift from Dr D. Gauchel (Universitätsklinik, Düsseldorf, BRD). The Terra-Marine material, which has been used also by CHUANG et al.<sup>5</sup>, was not chromatographically pure: The ara-CTP sample contained 60% ara-CTP, 25% dCTP or CTP and 15% mono-, di- and tetraphosphates as analyzed by anionic exchange column chromatography<sup>9</sup>; the ara-ATP sample contained 54% ara-ATP and 36% ATP as analyzed by TLC with solvent 2<sup>4</sup>. The Terra-Marine material was purified; ara-CTP according to CHOU et al.<sup>9</sup> and ara-ATP according to MÜLLER et al.<sup>4</sup>.

The enzyme assays (volume 100  $\mu$ l) were composed as follows: 20 mM tris-HCl (pH 7.8), 40 mM KCl, 100 mM ( $NH_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM dithiothreitol, 0.1 mM