

appreciable alkaline hydrolysis of alkylated as well as depurinated DNA occurred. In order to determine the effect of ionic strength on denaturation, the experiments shown in the figures e, f, g, h were done. DNA was alkylated for different periods in 0.01 M NaCl and subjected to hydroxyapatite chromatography. A DNA nucleotide/DMS molar ratio of 1:4 was chosen since this causes minimum depurination of alkylated DNA. Almost all the DNA molecules are denatured after incubation for 10 h in 0.01 M NaCl (figure g), while only 50% molecules are denatured in 0.1 M NaCl in the same period (figure h). A control DNA sample kept in 0.01 M NaCl at room temperature for 10 h did not show any production of denatured molecules. In all experiments where alkylation was done in the presence of 0.01 M NaCl, some A_{260} absorbing material was eluted with 0.1 M phosphate buffer, which corresponded to mononucleotides.

The major sites of alkylation in DNA with DMS are the N-7 position of guanine and N-3 position of adenine¹⁵. Hsiung et al.⁸ observed a relationship between the decrease in fluorescence of intercalated ethidium and the extent of alkylation of DNA at pH 7.0. This was attributed to the charge repulsion between the quarternized alkylated bases and the positively charged ethidium which resulted in a decrease in the number of ethidium-binding sites. It is possible that the positive charges of the quarternized alkylated bases alone through repulsion may adversely effect the forces stabilizing the secondary structure of DNA. Regardless of the precise interpretation of our results, it is clear that alkylation of DNA makes the secondary structure of DNA relatively unstable compared with that of the native molecule.

15 P. Lawley and C. J. Thacher, *Biochem. J.* 116, 693 (1970).

Neuroactifs et tératogénèse vertébrale chez l'embryon d'oiseau

Neuroactive compounds and vertebral teratogenesis in the bird embryo

R. Meinier

Laboratoire de Biologie Animale, E. R. A., C. N. R. 408, BP 45, F-63170 Aubière (France), 18 mars 1977

Summary. Anticholinesterasic and depolarizing (analogues of acetylcholine) agents administered to quail embryos after 3 days of incubation give rise to vertebral fusions in addition to neck deformities. Antagonists of acetylcholine (gallamine and hexamethonium) produce only vertebral joint fusions. The incidence of all these compounds in the vertebral defects by the way of there neuroactive properties is proposed.

Les malformations du rachis provoquées par les insecticides organophosphorés, insensibles à un apport de nicotinamide exogène¹⁻², sont au contraire moins accentuées ou abolies si des agents connus pour réactiver les cholinestérases phosphorylées sont administrés conjointement à ces tératogènes¹⁻³.

D'après ces données il a été suggéré que les processus inhérents aux fonctions cholinergiques pouvaient être impliqués dans les désordres morphogénétiques axiaux induits par les esters phosphoriques. Pour étayer cette idée, il nous a paru important de rechercher si des anomalies vertébrales, semblables à celles induites par les organophosphorés, pouvaient être reproduites par d'autres drogues, également bien connues pour leurs interférences avec la physiologie neuromusculaire. Nous rapportons ici les résultats relevés au niveau de la région cervicale de l'axe vertébral d'embryons de caille, exposés chroniquement à des organophosphorés et à des carbamates anticholinestérasiques, à des analogues structuraux de l'acétylcholine, ainsi qu'à deux antagonistes de ce neurotransmetteur.

Matériel et techniques. Les œufs de *Coturnix coturnix japonica* sont issus de l'élevage du laboratoire et reçoivent à 3 jours d'incubation des injections intra-vitellines de différents produits dont les concentrations et la nature sont précisées ci-après: 75 µg de nitrosthigmine (Pestanal), 250 µg de dicrotophos (Shell), 500 µg de sulfate de physostigmine (Prolabo), 500 µg de bromure de néostigmine (Merck), 2,5 mg de bromure de démécarium (Merck Sharp and Dohme), 1,5 mg de bromure de dexaméthonium (Fluka) et 1,5 mg de carbachol (Fluka). Pour la gallamine (Rhône-Poulenc) 2 injections de 5 mg chacune sont faites à 3 et 6 jours et pour l'héxaméthonium (Fluka), une première administration de 10 mg à 3 jours est suivie d'une seconde de 5 mg à 6 jours. Les sacrifices sont réalisés aux 10 ou 11èmes jours. Les examens histologiques sont effectués sur des coupes à la paraffine colorées à l'hématoxyline-éosine.

Résultats. Seuls les survivants aux administrations de gallamine et d'héxaméthonium montrent un aspect morphologique externe voisin de la normale. Les sujets ayant survécu à tous les autres traitements sont dotés de malformations cervicales (figures 1 à 4) dont la gravité décroît conformément à la sériation suivante: nitrosthigmine > néostigmine > carbachol > dexaméthonium > dicrotophos > physostigmine > démécarium. Avec le dicrotophos et la physostigmine, s'ajoutent aux déformations du cou (court et tordu), des anomalies du bec et des pattes (figure 3).

Les examens histologiques montrent que les anomalies cervicales sont dues, d'une part, à un retard de développement des pièces squelettiques (comparer les figures 6 et 7 avec la figure 5) et d'autre part, à des torsions de l'axe vertébral (cyphoses et/ou lordoses). Les torsions les plus accentuées sont situées à un niveau postérieur à la 8^e vertèbre cervicale (figure 6); la partie antérieure du rachis étant généralement dépourvue de violents plissements (figures 6 et 7).

Tous les agents éprouvés ici provoquent la fusion de certaines pièces vertébrales. Les soudures sont particulièrement évidentes au niveau des premiers neurarcuaux (figures 6, 7 et 8) et dans la région du joint crânio-vertébral.

L'étendue des zones ankylosées est toutefois sujette à des variations; elle est d'autant plus développée que les déformations sont plus accentuées. Une autre caractéristique, évidente avec les agents les plus actifs, réside dans une atrophie de la musculature vertébrale.

Discussion. Parmi les tératogènes envisagés ici, seuls la physostigmine et le dicrotophos entraînent la micromélie et les anomalies du bec; ceci est un argument supplémentaire pour considérer que les déficiences de la morphogénèse du bec et des membres obéissent à un déterminisme différent de celui impliqué dans les malformations axiales¹⁻⁴. Par contre, tous les toxiques que nous avons étudiés sont capables d'induire des anomalies axiales ma-

térialisées par des fusions de pièces vertébrales associées ou non à des torsions du rachis. Ces observations sont conformes à celles réalisées par plusieurs auteurs⁴⁻⁸ ayant reconnu, notamment chez le poulet, la sensibilité de l'axe vertébral à l'action des drogues curarisantes. Cependant aucune relation n'a été établie entre les propriétés des divers composés et l'expression des anomalies. Notre étude comparative nous amène à formuler plusieurs considérations; selon le mode d'action pharmacologique des agents que nous avons étudiés, des types de réponses particuliers ont été obtenus. Les antagonistes de l'acétylcholine, qui agissent en privant les récepteurs nicotiniques de l'effet du neurotransmetteur ne produisent pas de graves malformations accessibles à l'examen macroscopique mais on note la présence de soudures de vertèbres. Les autres drogues (anticholinestérasiques et analogues structuraux de l'acétylcholine) qui favorisent indirectement ou directement la dépolarisation postsynaptique engendrent, en plus des soudures vertébrales, des torsions axiales. En fait, toutes les drogues éprouvées sont capables, en empruntant des voies différentes, d'interrompre la transmission neuromusculaire⁹ et chacune d'entre elles se révèle susceptible d'entraîner des fusions de pièces vertébrales. Si les torsions peuvent être liées aux facultés dé-

polarisantes des neuroactifs, les soudures d'élément squelettiques semblent devoir résulter d'un état d'inactivité musculaire prolongé, privant l'embryon du rôle morphogène fondamental joué par les mouvements au cours de la différenciation des diathroses¹⁰⁻¹³. Les expériences de paralysie chimique fournissent au niveau axial (voir aussi Murray et Drachman¹² avec la toxine botulinique) des

- 1 R. Meiniel, *Experientia* 32, 920 (1976).
- 2 R. Meiniel, *Archs Anat. microsc. Morph. exp.* 65, 1 (1976).
- 3 R. Meiniel, *C. r. Acad. Sci. (Paris)* 283, 1085 (1976).
- 4 W. Landauer, *Teratology* 12, 125 (1975).
- 5 E. D. Bueker et W. S. Platner, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 91, 539 (1956).
- 6 W. Landauer, *J. exp. Zool.* 143, 107 (1960).
- 7 G. Strudel, *C. r. Acad. Sci. (Paris)* 272, 673 (1971).
- 8 R. Meiniel, *Wilhelm Roux Archs*, 181, 41 (1977).
- 9 L. S. Goodman et A. Gilman, dans: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McMillan, London 1975.
- 10 G. E. Sullivan, *Austr. J. Zool.* 14, 1 (1966).
- 11 D. B. Drachman et L. Sokoloff, *Devl Biol.* 14, 401 (1966).
- 12 P. D. F. Murray et D. B. Drachman, *J. Embryol. exp. Morph.* 22, 349 (1969).
- 13 G. Gottlieb, *a Recherche* 7, 833 (1976).

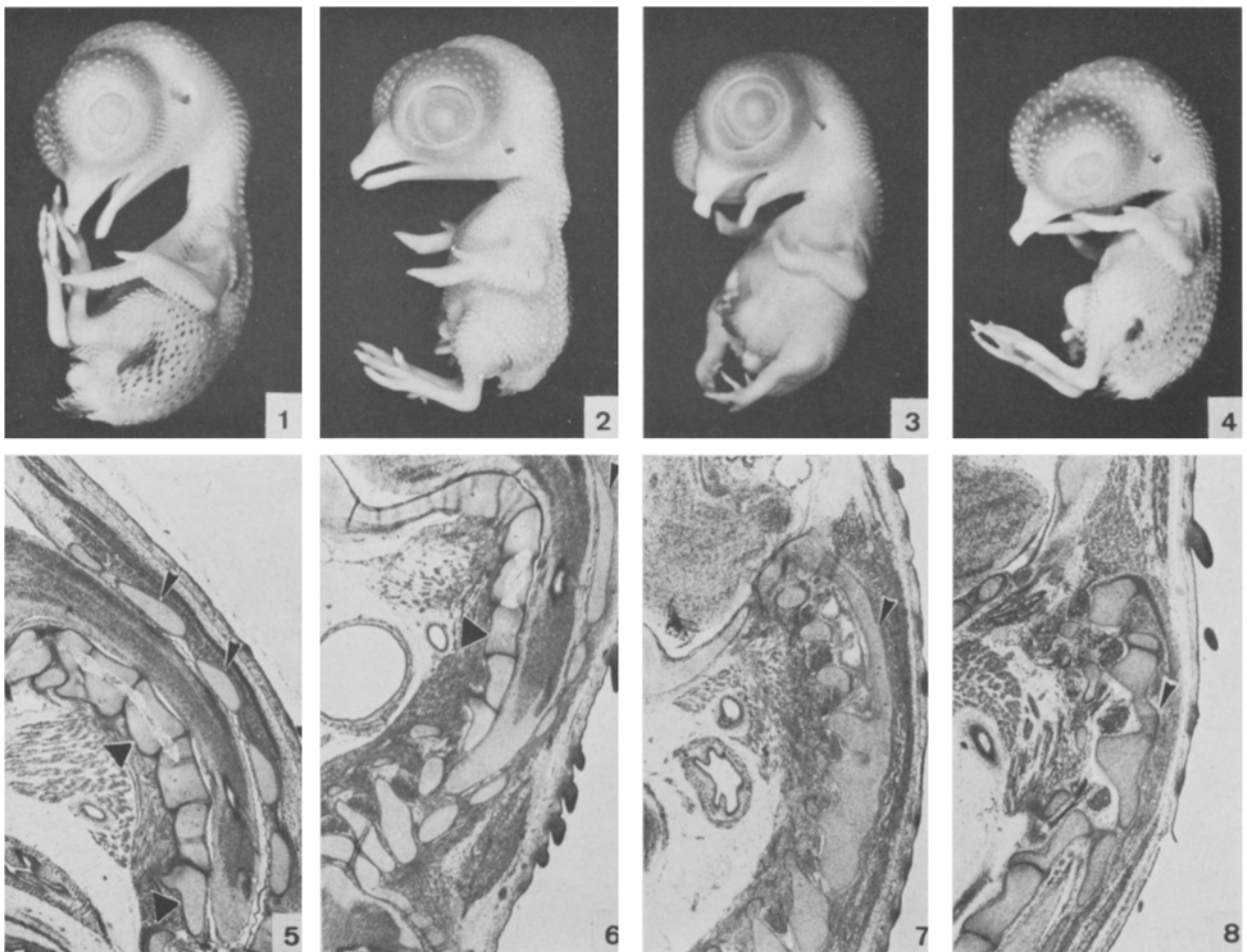


Fig. 1. Embryon témoin de 9 jours. Figures 2, 3 et 4. Embryons de 9, 10 jours exposés respectivement à la nitrosthigmine (fig. 2), au dicrotophos (fig. 3) et au dècaméthonium (fig. 4). Noter le raccourcissement du cou chez tous les sujets traités et la présence de la micromélie uniquement chez l'embryon exposé au dicrotophos (fig. 3). Figures 1-4, $\times 2,5$.

Fig. 5. Coupe sagittale des régions axiales antérieures chez un embryon de contrôle, les arcs neuraux (flèches fines) et les corps vertébraux (flèches épaisses) sont bien individualisés. Après l'injection de néostigmine (fig. 6) et de carbachol (fig. 7), des fusions vertébrales très étendues sont visibles. Sur la figure 6, on peut remarquer en outre une violente torsion à concavité ventrale. Avec la gallamine (fig. 8), des fusions affectent également plusieurs arcs neuraux. Figures 5-8, $\times 15,5$.

résultats superposables à ceux obtenus au niveau des articulations périphériques dans différentes conditions qui aboutissent à l'immobilité des structures squelettiques (explantation en greffe ou en culture¹⁴⁻¹⁶, extirpation de la moelle épinière¹¹). Ainsi, il apparaît possible d'associer les troubles tératologiques axiaux induits par des agents

neuroactifs aux perturbations fonctionnelles inhérentes à leurs propriétés pharmacologiques reconnues.

14 H. Fell and R. B. Canti, Proc. roy. Soc. 176, 316 (1934).
15 V. Hamburger and M. Waugh, Physiol. Zool. 13, 367 (1940).
16 D. Mitrovic, C. r. Acad. Sci. (Paris) 278, 1629 (1974).

Comparative incorporation of uridine-³H into nucleolar RNA of mouse subcutaneous and skin tissues at early times after 20-methylcholanthrene administration

P. K. Gulati and D. P. Dubey

Department of Biophysics, Panjab University, Chandigarh-160014 (India), 13 November 1975

Summary. A single s.c. injection of 20-methylcholanthrene (1 mg in 0.2 ml olive oil) is found to stimulate the relative uptake of uridine-³H by the skin and the s.c. tissue 17- and 3fold respectively, 24 h post-administration.

The changes in the uptake of labelled precursors of nucleic acids by DNA and RNA at an early stage following the administration of a carcinogen have been demonstrated by Paul¹; in that case, the RNA synthesis starts rising from 24 h onwards, reaching a peak value at 48 h after the administration of DMBA² into the mouse skin. The changes observed in the total RNA synthetic rates might reflect a change in the nucleolar function³. The early response of the RNA metabolism to carcinogen, promoters and even the treatment with a growth hormone, is found to involve a stimulated incorporation of the precursors into the various components of the cellular RNA^{1,4,5}. The preliminary work presented in this note deals with the alteration in the uridine-³H uptake by the nucleolar RNA of the skin and other tissues exposed directly or indirectly to a single carcinogenic dose of 20MC

soon after administration. The functional significance of these changes in the overall carcinogenic event is yet to be established; however, the knowledge of these changes may indicate the importance of the nucleolar function in the process of carcinogenesis.

55 C57BL/Bcr female mice (8-9 weeks old) of about 25g, were used in the present experiment. Animals were maintained on the standard chow diet, with water available ad libitum. Each mouse was injected with 20MC (1 mg in 0.2 ml olive oil/25 g b.wt) s.c. 15 female mice were used for the study of initial events, whereas the remaining animals were maintained to observe the development of tumors. At each point, 3 animals were used in the study and the tissues were pooled.

20MC treated mice at different hours were given an i.p. injection of uridine-³H (sp. activity-2.7 Ci/mM) at a dose of 6 μ Ci/g b.wt and were decapitated 2 h after the injection, between 13.00 and 15.00 h to minimize the error owing to diurnal variation in the cell metabolism. Tissues were excised and chilled in 1.5% citric acid. Nuclei, isolated by citric acid procedure of Busch⁶, were subjected for isolation of nucleoli (Penman⁷). The entire procedure is published elsewhere⁸. The pellet was considered to be the nucleolar fraction on the basis of evidence from electron microscopy (figure 1) and polyacrylamide gel electrophoresis⁸. The RNA from the nucleolar pellet dispersed in SDS buffer (0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.01 M Tris/HCl at pH 7.4 and 0.5% SDS) was extracted with phenol EDTA solution at 55°C. The optical density was determined with Backman DU-2 spectrophotometer and the activity due to tritium was counted with the liquid scin-

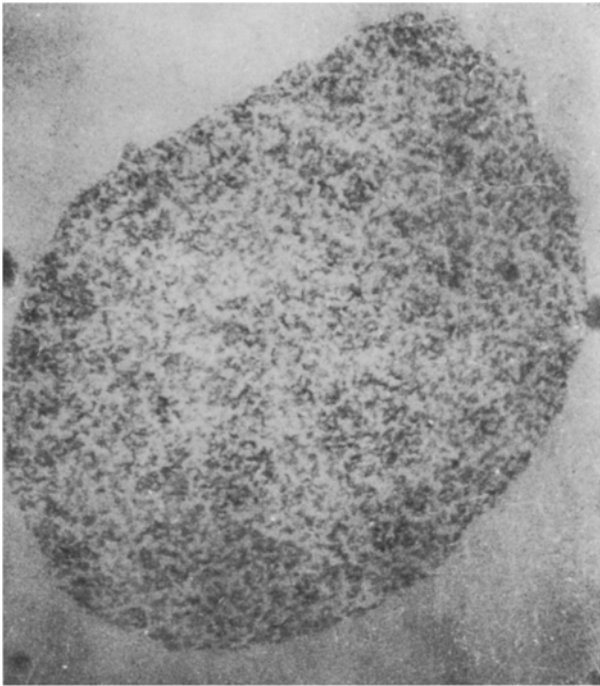


Fig. 1. Electron micrograph of a single nucleolus ($\times 30,000$) isolated by Citric Acid-Detergent Mixture Technique⁸ fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide embedded in epon, stained in lead citrate and uranyl acetate. The boundry of structure is apparently free of cytoplasmic tags satisfying criteria of purity.

Sr. No.	Time (h)	Counts/A ₂₆₀ /min		Ratio T/S
		Treated (T)	Control (S)	
Skin tissue				
1	0	186	186	1.00 ± 0.460
2	19.5	623	1361	0.458 ± 0.105
3	21.5	270	256	1.054 ± 0.645
4	24.5	72850	4410	16.520 ± 0.780
5	37.5	785	1000	0.785 ± 0.235
S.c. Tissue				
1	0	889	889	1.000 ± 0.3800
2	19.5	333	1370	0.243 ± 0.118
3	21.5	464	293	1.583 ± 0.658
4	24.5	25000	8890	2.812 ± 0.395
5	37.5	477	651	0.734 ± 0.506