

is completed only in 14 min, which can be attributed to a poorer synchrony. Similar calculations yield a specific acid release of $1.2 \times 10^{-12} \text{ M H}^+$ per egg. This result is in agreement with that of the previous experiment, since the 1st effect of fertilization is to lead eggs to the metaphase I stage with a timing similar to maturation. In experiment C only 70% of eggs matured upon addition of ionophore, probably because of insufficient mixing of this highly hydrophobic drug. The graph was corrected as if 100% activation had been obtained, for direct comparison with the precedent records. It shows that an acid release occurs which stabilizes itself in about 12 min. Calculations give a specific acid release of $9 \times 10^{-13} \text{ M H}^+$ per activated egg, which is only slightly less than the values obtained in other experiments where 100% activation was induced. The kinetic is slow by comparison with records A and B and shows a noticeable lag. This is characteristic of threshold activation since it is not observed with more intensely activated eggs, as already noticed in sea urchin eggs⁹. A special feature of activation by ionophore is the persistence of an increased acid release after completion of maturation, which corresponds to almost twice that of unstimulated eggs. This may correspond to an ionophore-mediated exchange of intracellular protons for extracellular divalent cations¹⁰ or to an indirect effect of permeability changes in the cytoplasmic membrane or intracellular organelles membranes. Experiment D shows an attempt to detect an acid extrusion at fertilization of metaphasic oocytes, previously matured under the action of protease. Fertilization ratio is always low because of the high density of stirred egg suspension necessary for acid release studies. So in experiment D, only 27% of eggs were fertilized and, as there is no significant change in acid release, the curve cannot be corrected to simulate 100% fertilization. It can thus be concluded that fertilization of metaphasic oocytes is not accompanied by an acid release, or at least not of the same order of magnitude as that observed during maturation.

So the acid release in *Sabellaria* eggs shows striking similarities with that of *Urechis* and sea urchin eggs. The kinetic of acid release is roughly similar and the total amount of acid liberated is comparable, especially if one considers the ratio of acid released (in pmoles) per egg volume (in $\mu\text{m}^3 \times 10^6$) which is here 9.7 with protease, 9.3 with sperm and 7.0 with ionophore while they are 5.2 for *Urechis*, 6.7 for *Strongylocentrotus purpuratus* and 7.2 for *Dendraster excentricus*⁴. Special features are that fertilization can occur in *Sabellaria* without noticeable acid release, while maturation is always accompanied by it. However it must be noticed that *Urechis* eggs are fertilized as prophase oocytes, so that acid release occurs in this species during the same cytological processes as maturation in *Sabellaria*. There is at present no indication on the biochemical basis of acid release in *Sabellaria*. At first sight, the temporal correlation which exists between acid extrusion and cortical reaction could suggest that acid might originate from the content of cortical granules, but recent discoveries on sea urchin eggs seem to argue against such an interpretation.

- 1 G. Giudice, Developmental biology of the sea urchin embryo. Academic Press, New York 1973.
- 2 M. Paul, J.D. Johnson and D. Epel, J. expl. Zool. 197, 127 (1976).
- 3 J.D. Johnson, D. Epel and M. Paul, Nature 262, 661 (1976).
- 4 M. Paul, Devl Biol. 43, 299 (1975).
- 5 G. Peaucellier, Expl Cell Res. 106, 1 (1977).
- 6 J.J. Pasteels, Archs Biol. 76, 463 (1965).
- 7 G. Peaucellier, C. r. Acad. Sci. Paris 285 D, 913 (1977).
- 8 G. Peaucellier, P. Guerrier and J. Bergerard, J. Embryol. expl Morph. 31, 61 (1974).
- 9 M. Paul and D. Epel, Expl Cell Res. 94, 1 (1975).
- 10 P.W. Reed and H.A. Lardy, in: The role of membranes in metabolic regulation, p.111. Ed. M.A. Mehlman and R.W. Hanson. Academic Press, New York 1971.

Etude du développement des membres postérieurs de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien, Urodèle) après la résection de l'épiderme du bourgeon

Study of the hind-limb development in the newt *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibiae, Urodela) after epidermis removal of the bud

M. Lauthier

Laboratoire de Biologie du Développement, Université Pierre et Marie Curie, et Laboratoire de Cytologie expérimentale du CNRS, 67, rue Maurice Günsbourg, F-94200 Ivry (France), 26 Octobre 1977

Summary. Epidermis removal of the hind-limb bud of the newt *Pleurodeles waltlii* throughout early stages of development is followed by the overlaying of stripped mesodermal bud by the epidermis of the dorsal and ventral fins. This removal never gives any deficiency of the proximo-distal sequence of the limb.

Chez les amniotes, et chez le poulet en particulier, l'épiderme apical est différencié en une crête apicale épidermique. Selon l'hypothèse de Saunders¹, reprise par la majorité des auteurs, cette crête apicale épidermique est en interaction avec le mésoderme sous-jacent au cours de l'établissement de la séquence proximo-distale du membre. Chez le pleurodèle, par contre, l'épiderme des bourgeons du membre postérieur ne présente, au cours de leur morphogénèse, aucune différenciation histologique, ultrastructurale ni histoenzymologique particulière^{2,3} et nous avons suggéré que si l'épiderme du bourgeon de membre postérieur joue un rôle inducteur tout l'épiderme est concerné et non seulement, comme chez les amniotes, celui de l'extrémité apicale; cependant la réalité et le rôle morphogénétique d'éventuelles interactions doivent être démontrés.

Nous avons analysé, dans un premier temps, les effets de la résection de l'épiderme du bourgeon aux stades précoces de son développement. Les résultats obtenus font l'objet de cette note.

Matériel et techniques. Nous avons effectué des résections de l'épiderme du bourgeon de membre postérieur à partir du stade I jusqu'au stade V³. Les larves ont été anesthésiées à l'aide de MS 222 (Sandoz) et opérées dans la solution physiologique stérile de Steinberg⁴; les résections ont été réalisées chirurgicalement et tout l'épiderme du bourgeon a été enlevé ainsi qu'une portion importante de l'épiderme du flanc. Un certain nombre de larves ont été fixées immédiatement après l'opération; les autres ont été élevées individuellement dans des cristallisoirs. Certaines d'entre elles ont été sacrifiées en cours de développement et fixées

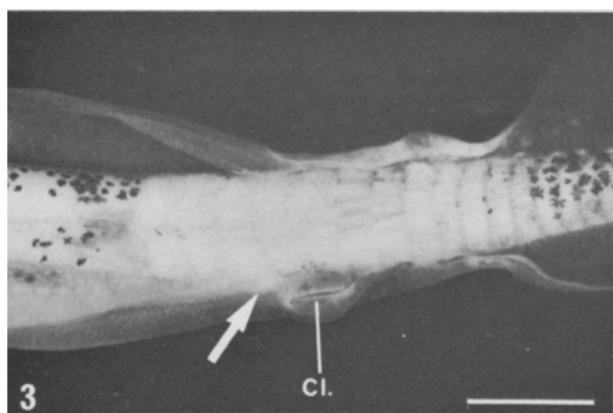
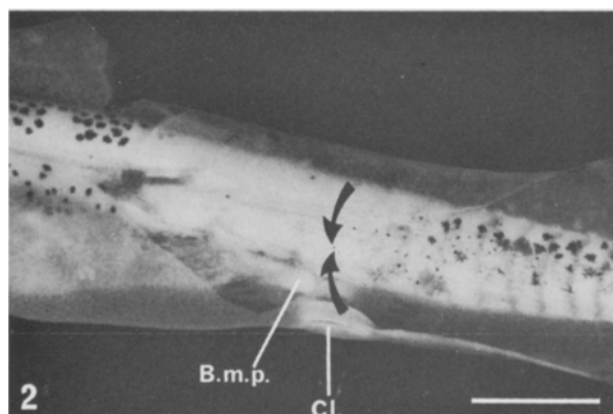
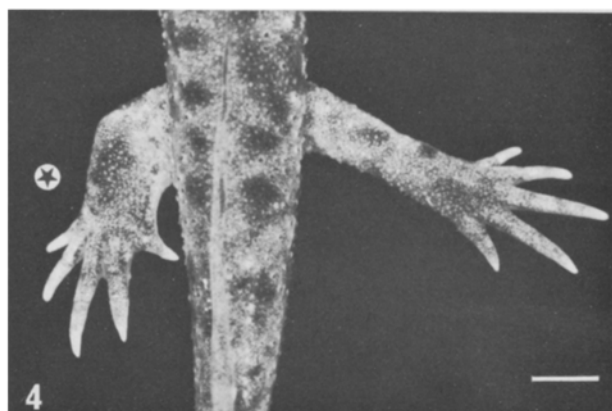
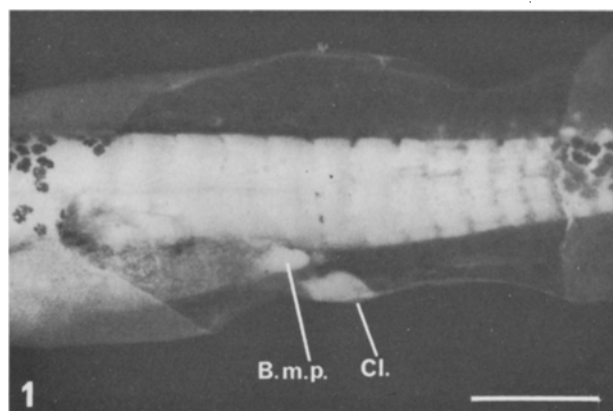


Fig.1. Témoin d'une opération au stade Vb. Fig.2. 2 h après l'opération: l'oblitération de la plaie est en cours (flèches). Fig.3. 3 jours après l'opération: l'oblitération de la plaie est effectuée; le bourgeon mésodermique du membre postérieur est visible à travers l'épiderme de remplacement (flèche). B.m.p., bourgeon du membre postérieur; Cl., cloaque. Les traits d'échelle des figures 1, 2 et 3 représentent 1 mm.

Fig.4. Après le stade de la métamorphose (l'étoile indique le côté opéré): le membre opéré est plus court et partiellement soudé au flanc. Fig.5. Après le stade de la métamorphose: le membre opéré est plus court, partiellement soudé au flanc et présente une polydactylie post-axiale (flèche). Les traits d'échelle des figures 4 et 5 représentent 2 mm.

en vue de leur étude histologique; les autres ont été élevées jusqu'à la métamorphose avant d'être fixées à leur tour. Les larves destinées à l'étude histologique ont été fixées par le liquide fixateur de Bouin-Hollande et les autres par une solution de formol à 4%. L'étude histologique a été réalisée après inclusion dans la paraffine et coloration des coupes par le glycémalun-éosine. Les données numériques concernant l'ensemble des opérations réalisées sont rassemblées dans le tableau.

Résultats. Dans nos conditions expérimentales, l'oblitération de la plaie s'effectue d'elle-même, au cours des 2 premiers jours post-opératoires. L'épiderme des nageoires dorsale et ventrale se rabat latéralement et vient recouvrir le bourgeon mésodermique dénudé (figures 1-3).

A tous les stades étudiés, l'opération a pour conséquence un retard de la morphogenèse du membre opéré, retard qui est comblé au stade de la métamorphose. A la suite des résections d'épiderme effectuées aux stades I et II, le

membre opéré est toujours normal après la métamorphose. A la suite des résections effectuées aux stades III, IV et V, le membre opéré est: soit normal, soit déformé (plus court et plus ou moins soudé au flanc) (figure 4), soit déformé et affecté d'une polydactylie post-axiale (figure 5).

Discussion. Les déformations observées à partir du stade III, sont la conséquence du fait que le bourgeon mésodermique, conique ou cylindrique, se retrouve emprisonné sous l'épiderme de remplacement et qu'il ne réussit, par la suite, qu'à émerger partiellement du flanc. La polydactylie post-axiale n'affecte que les membres qui présentent ces déformations et elle semble donc corrélative de conditions anormales dans lesquelles se développe le bourgeon mésodermique recouvert par l'épiderme de remplacement. Il est intéressant de remarquer, enfin, que le nombre de cas de déformation et de polydactylie post-axiale est d'autant plus important que l'opération a été pratiquée plus tardivement et que le bourgeon mésodermique dénudé et emprisonné

Stades	Nombre d'opérations	Animaux survivants	Animaux élevés jusqu'à la métamorphose	Animaux présentant 1 membre normal	Animaux présentant 1 membre déformé	Animaux présentant 1 membre déformé et affecté d'une polydactylie post-axiale
I	44	10	10	10 (100%)	0 —	0 —
II	48	32	26 (6)*	26 (100%)	0 —	0 —
III	160	63	34 (29)*	32 (94%)	1 (3%)	1 (3%)
IV	65	29	20 (9)*	14 (70%)	2 (10%)	4 (20%)
Va	64	29	19 (10)*	6 (31,5%)	7 (37%)	6 (31,5%)
Vb	70	35	16 (19)*	2 (12,5%)	4 (25%)	10 (62,5%)

* Nombre des animaux survivants fixés en vue de l'étude du membre opéré, en cours de morphogénèse.

sous l'épiderme de remplacement était plus développé (tableau).

Nous n'avons jamais observé de déficience de la séquence proximo-distale du membre. Le problème se pose quant au rôle joué par l'épiderme au cours du développement du membre postérieur du pleurodèle, aux stades considérés. Si l'épiderme du bourgeon de membre joue un rôle inducteur semblable à celui de la crête apicale épidermique des amniotes, cela implique que l'épiderme de remplacement est resté suffisamment indifférencié pour prendre le relais de l'épiderme du membre dans le jeu des interactions inductrices épiderme-mésoderme; si, par contre, l'épiderme ne joue pas un tel rôle morphogénétique, le mésoderme du bourgeon doit posséder toutes les potentialités pour former

un membre dont la séquence proximo-distale est complète, quelle que soit la nature de l'épiderme qui le recouvre. A cet égard, nos expériences ne sont pas définitives; seul l'épiderme des nageoires dorsale et ventrale a été éprouvé dans les conditions particulières décrites. Des recherches expérimentales ultérieures seront consacrées à l'étude de l'importance, dans le développement du membre postérieur, d'épidermes de remplacement de nature différente, et à celle du rôle du composant mésodermique.

- 1 J. W. Saunders, *J. exp. Zool.* 108, 363 (1948).
- 2 M. Lauthier, *Wilhelm Roux'Archiv* 175, 185 (1974).
- 3 M. Lauthier, *J. Embryol. exp. Morph.* 38, 1 (1977).
- 4 M. Steinberg, *Carnegie Inst. Wash. Yb.* 56, 347 (1957).

Cytoskeletal filaments of heart conducting system localized by antibody against a 55,000 dalton protein

A. Eriksson, L.-E. Thornell and T. Stigbrand

Department of Anatomy, and Department of Physiological Chemistry, University of Umeå, S-90187 Umeå (Sweden), 21 October 1977

Summary. Cow heart conducting cells characteristically contain cytoplasmic intermediate-sized filaments. We report here the preparation of a specific antibody to a 55,000 dalton protein of isolated cow Purkinje fibres. Confirmation has been obtained that these filaments consist of the 55,000 dalton protein, using the indirect immunofluorescence technique. Cross-reaction is seen with vascular endothelium and smooth muscle cells of various origin, suggesting close identity of different types of intermediate-sized filaments.

Cytoplasmic filaments (100-Å filaments, intermediate filaments) distinct from myofilaments and microtubules have been demonstrated in a wide variety of cell types¹⁻⁴. Tonofilaments and neurofilaments belong morphologically to the same class of filaments. Several proposed functions of these cytoplasmic filaments have been suggested, of which the cytoskeletal one seems to be the best justified⁵⁻⁷. Several authors have reported the mol. wt of the filament protein subunit to be about 55,000 daltons⁴⁻¹⁰. However, few have presented data on direct biochemical^{4,5} and immunohistochemical^{1,8} comparison of these morphologically related filaments.

Cow heart Purkinje fibres contain large numbers of intermediate-sized filaments which can be concentrated using detergents and actomyosin extractants⁶. To investigate further the antigenic relationship between filaments of various cell types and under various conditions, we have prepared an antibody to the 55,000 dalton protein from isolated Purkinje fibre strands of cow heart. We report here the staining of Purkinje fibre cytoplasm, as well as smooth muscle and vascular endothelial cells, by the indirect fluorescein-labeled technique using anti-serum against the 55,000 dalton protein.

Purkinje fibre columns were isolated mechanically from the surrounding connective tissue sheath yielding a pure

fraction of conducting cells¹¹. Isolated cells and cell columns were extracted with Triton X-100 and alternating high and low ionic-strength solutions in order to remove membranes and myofibrillar proteins. This procedure gives a fraction of cytoplasmic filaments, Z disk material and desmosomes. In spite of this extensive extraction of structural components, the 3-dimensional appearance of the cell columns remained intact (figure 1). This finding strongly supports the idea that cytoplasmic filaments perform a cytoskeletal role. The extensive cytoskeleton of these cells is perhaps related to the considerable tension forces to which the conducting cells are exposed during heart work.

SDS gel electrophoresis of extracted material revealed a major 55,000 dalton protein believed to constitute the filaments, and a 110,000 dalton component, probably an α -actinin, believed to correspond to the remaining Z disk and desmosome material⁶. After extraction, the concentrated fraction was dissolved in SDS buffer. The 55,000 dalton protein was highly purified by chromatography on an AcA-44 gel filtration column. Amino acid analysis (unpublished work) showed a close similarity to the reported composition of brain neurofilaments¹⁰, astrocyte filaments¹² and smooth muscle 100-Å filaments⁵.

Antiserum to the 55,000 dalton protein was produced by injecting rabbits s.c. with 500 µg of the purified protein in