

some of the currently held concepts regarding leukocyte mobilization need re-evaluation. G. J. FRUHMANN

Department of Anatomy, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, New York, April 11, 1959.

Zusammenfassung

Es gibt zahlreiche Berichte darüber, dass intraperitoneale Injektion von physiologischer Kochsalzlösung bei Säugetieren eine lokale Mobilisierung neutrophiler Leukocyten verursacht. Diese Reaktion bleibt bei Verwendung nicht-pygener NaCl-Lösung aus, tritt jedoch bei Zusatz von Bakterienextrakt zu dieser Lösung wieder auf. Zellzählungen ergeben ebenfalls eine erhöhte Zahl von mononukleären Leukocyten (Makrophagen und Lymphocyten) in der Peritonealflüssigkeit. Geringste Verunreinigungen der verwendeten Kochsalzlösungen dürften in zahlreichen früheren Untersuchungen zu falschen Schlussfolgerungen geführt haben, weshalb eine Reihe allgemein anerkannter Hypothesen über die Leukocytenmobilisierung neu zu bearbeiten wären.

Gastrulation in the Housefly, *Musca vicina*, Macquart

Among the muscids, the gastrular movements begin after the cytoplasmic layer ('innere blastemina') has become incorporated in the blastoderm and the delimitation of the blastoderm cells has been completed. In other insects also (where the 'innere blastemina' does not develop), gastrulation takes place after delimitation of the blastoderm cells. In the case of the housefly studied here, however, the gastrular invagination begins even before the cell furrows have fully developed and the blastoderm is still syncytial (Fig. 1). This feature in *M. vicina* would indicate that the morphogenetic forces responsible for gastrulation are not localised in the individual cells but are spread over the whole mid-ventral strip of the blastoderm. It may indeed be that the forces involved originate in the cortex of the egg, as shown in amphibian eggs (HOLTFRETER¹).

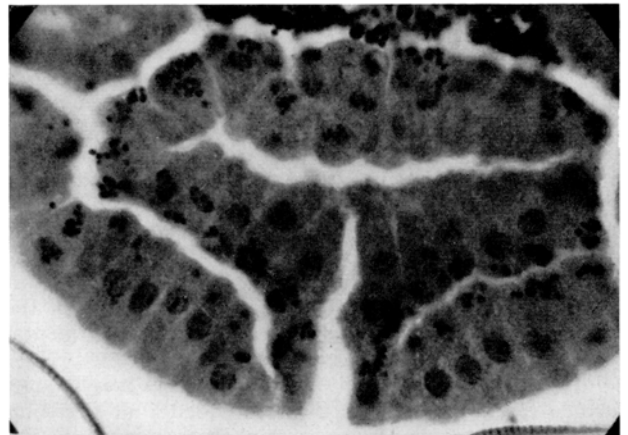
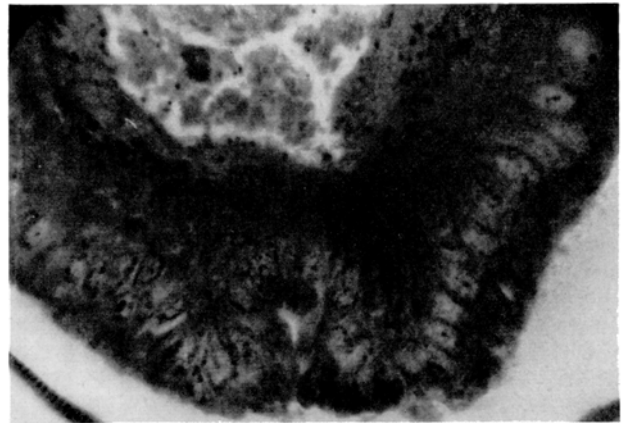
Another noteworthy feature is that the 'innere blastemina' (whose incorporation in the blastoderm is responsible for the great thickness of the blastoderm seen in Figure 1) is rich in ribonucleic acid and glycogen, as demonstrated by histochemical techniques used along with the appropriate controls. The 'innere blastemina' also has basophil granules (probably derived from yolk globules) which become localised in the inner portion of the blastoderm after the incorporation of the former in the blastoderm. The outer portion of the blastoderm, however, is composed of the original egg cortex. This orientation is retained in the ectodermal cells but, in the mesoderm cells, the granule bearing areas begin to face outwards due to gastrulation (Figure 2).

Details of the morphological and histochemical study of the early embryology of the housefly would be published elsewhere.

N. I. BHUIYAN and S. A. SHAFIQ

Department of Zoology, Dacca University, Dacca (Pakistan), January 8, 1959.

¹ J. HOLTFRETER, J. exp. Zool. 93, 251 (1943).



20 μ

Fig. 1.—Transverse section of the egg showing the beginning of the gastrular invagination even though cell furrows have not fully developed.

Fig. 2.—Transverse section of the egg showing the cells of the ectoderm and the mesoderm tube. In the former, the granules are seen in the inner ends of the cell; in the latter, they are in the outer portions.

Résumé

L'«innere blastemina» de l'œuf de la mouche domestique est riche en acide ribonucléique et en glycogène. Ce stratum s'incorpore dans le blastoderme et le mouvement gastrulaire commence peu après, avant même que la délimitation des cellules soit complète. La signification de ce caractère est soulignée.

Etude immuno-électrophorétique de l'uromucoïde

On sait que l'urine normale renferme une mucoprotéine, dite *substance de TAMM et HORSFALL*¹ ou *uromucoïde* (BOYCE²), qui est réputée être particulièrement insoluble dans des solutions salines, même faibles.

Il nous a paru intéressant de vérifier, au moyen d'un antisérum spécifique, si une précipitation saline par le

¹ I. TAMM et F. L. HORSFALL, J. exp. Med. 95, 71 (1952).

² W. H. BOYCE, F. K. GARVEY et C. M. NORFLEET, J. Urol. 72, 1019 (1954).

NaCl pouvait complètement débarrasser l'urine de ce constituant colloïdal.

Nous avons préparé un échantillon d'uromucoïde par un procédé très voisin de la méthode de TAMM et HORSFALL¹. Des urines normales, diluées deux fois par de l'eau distillée, furent amenées au pH 6, puis additionnées de 35 g/l de NaCl et de 5 g/l de NaN_3 (à titre d'antiseptique). Les flocons blancs d'uromucoïde furent séparés du surnageant par sédimentation durant plusieurs heures à $+2^\circ\text{C}$ et centrifugation. Après trois lavages salins la préparation fut suspendue dans un grand volume d'eau distillée, dans laquelle la plus grande partie passa en solution au bout de 48 h de repos à froid. Une filtration permit ensuite d'obtenir une solution quasi pure d'uromucoïde, qui fut concentrée par reprécipitation saline.

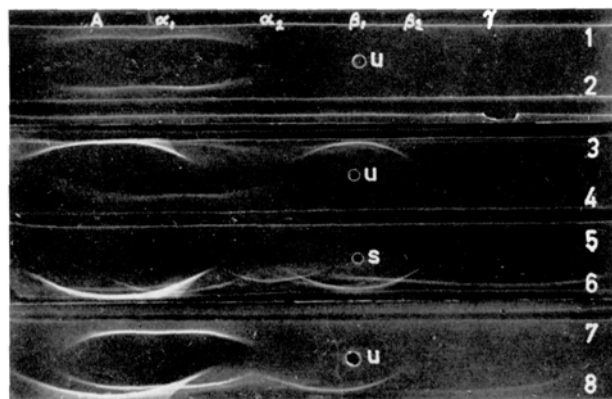
La suspension finale d'uromucoïde ainsi obtenue servit à l'immunisation d'un lot de lapins. Les animaux reçurent une première injection intra-musculaire de 5 mg d'uromucoïde mélangé avec 0,5 ml d'*adjuvant de Freund* (DIFCO). Après un repos d'un mois, trois autres injections de 5 mg d'uromucoïde sans adjuvant furent pratiquées à un mois d'intervalle chaque fois, et les animaux furent saignés 8 jours après la dernière injection.

L'antisérum anti-uromucoïde ainsi obtenu fut utilisé pour développer des immuno-électrophorèses de colloïdes urinaires. Nous avons décrit ailleurs³ la préparation des urines, qui aboutit à une concentration de l'ordre de 2000 à 3000 fois, par un procédé d'ultrafiltration combinée à de la dialyse. La microméthode de SCHEIDEGGER⁴, légèrement modifiée, fut utilisée pour l'immuno-électrophorèse.

L'immuno-électrophorèse de l'urine normale concentrée et préalablement débarrassée de la fraction de TAMM et HORSFALL¹ par précipitation avec du NaCl 0,58 M, révèle une seule et forte ligne de précipitation (Tracés 1, 2, 4 et 7). Celle-ci possède une double courbure, ce qui indique que l'antigène responsable est distribué sur deux sommets distincts.

La mobilité relative de ces deux sommets peut être déduite d'une confrontation avec des tracés développés par un antisérum dirigé contre les protéines sériques (Tracé 3) ou par un mélange d'antisérum anti-uromucoïde + antisérum anti-protéines sériques (Tracé 8). Il apparaît ainsi que le sommet le plus rapide a une mobilité intermédiaire entre celle de l'albumine et celle des α_1 -globulines, tandis que le sommet lent se situe entre les régions α_1 et α_2 .

On peut se poser la question de la nature de l'antigène qui a ainsi réagi avec l'antisérum anti-uromucoïde. Bien que les immunisations aient été faites avec la fraction de TAMM et HORSFALL purifiée, une éventuelle formation d'anticorps contre des impuretés imprévisibles de la préparation n'est pas à exclure a priori. Cependant, l'antisérum continue à développer la ligne de précipitation avec une netteté inaltérée lorsqu'on l'épuise au préalable avec du sérum humain normal (Tracé 2), tandis qu'il ne développe aucun précipité avec une électrophorèse de ce même sérum (voir 5); preuve que son antigène spécifique ne se trouve pas parmi les protéines sériques filtrées par le rein. Enfin, il devient entièrement inactif lorsqu'on l'épuise avec le produit de précipitation saline (0,58 M NaCl) d'urines normales, c'est-à-dire avec la fraction de TAMM et HORSFALL qui a servi à le préparer.



1. Urines concentrées, développées par un antisérum anti-uromucoïde.
2. Urines concentrées, développées par l'anti-uromucoïde préalablement épuisé au moyen de sérum humain normal.
3. Urines concentrées, développées par un antisérum contre les protéines du sérum humain normal.
4. Urines concentrées, développées par l'anti-uromucoïde.
5. Sérum humain normal, développé par l'anti-uromucoïde.
6. Sérum humain normal, développé par un antisérum contre les protéines du sérum humain normal.
7. Urines concentrées, développées par l'anti-uromucoïde.
8. Urines concentrées, développées par un mélange d'anti-uromucoïde et d'antisérum contre les protéines du sérum.

Il faut donc conclure que les urines, débarrassées de l'uromucoïde de TAMM et HORSFALL par précipitation saline, renferment toujours encore une petite quantité d'une mucoprotéine possédant la même structure antigénique que ce colloïde insoluble.

Il était cependant généralement admis, depuis les premiers travaux de TAMM et HORSFALL¹ que la «*urinary mucoprotein*» était quantitativement précipitée par le NaCl 0,58 M. Ce principe servait même de base aux dosages de cette substance, qui avaient révélé une excrétion d'environ 25 mg/l¹. Une faible solubilité de l'uromucoïde dans un tampon phosphate 0,025 M de pH 6,8 était néanmoins admise par PERLMANN *et al.*⁵ qui, à ce pH, trouvèrent une mobilité électrophorétique de

$$8,37 \text{ à } 9,16 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{V}^{-1}.$$

D'autre part BOYCE *et al.*⁶ soupçonnaient que l'un des petits sommets protéiques, qui dans l'électrophorèse en veine libre de leurs préparations d'urine normale concentrée précédaient l'albumine, pouvait correspondre à de l'uromucoïde. Or ils étudiaient la fraction des colloïdes qui était soluble dans le NaCl 1,00 M. Il semble plutôt, d'après nos résultats, que l'uromucoïde devait se trouver parmi les sommets α_1 et α_2 très élevés que comportaient leurs électrophorèses.

GRANT⁷, par une technique très voisine de la nôtre, développa des immuno-électrophorèses d'urine normale par un antisérum préparé contre l'uromucoïde, et obtint une assez longue ligne de précipitation dans la région α , probablement comparable à la nôtre. Mais les urines utilisées par lui n'avaient pas été, comme dans nos expériences, débarrassées au préalable de l'uromucoïde insoluble dans le NaCl 0,58 M.

³ J. F. HEREMANS, Clin. chim. Acta 3, 34 (1958).

⁴ J. J. SCHEIDEGGER, Intern. Arch. Allergy appl. Immunol. 7, 103 (1955).

⁵ G. E. PERLMANN, I. TAMM et F. L. HORSFALL, J. exp. Med. 95, 99 (1952).

⁶ W. H. BOYCE, F. K. GARVEY et C. M. NORFLEET, J. clin. Inv. 33, 1287 (1954).

⁷ G. H. GRANT, J. clin. Pathol. 10, 360 (1957).

Pour conclure il nous semble que l'uromucoïde existe dans les urines sous forme de toute une série de polymères qui dérivent d'une substance parfaitement soluble dans le NaCl concentré et migrant à l'électrophorèse comme une α_1 -globuline rapide. De petits polymères formeraient le second sommet électrophorétique mis en évidence par nos expériences. Les hauts polymères seraient insolubles dans le NaCl 0,58 M et constitueraient la «urinary mucoprotein» de TAMM et HORSFALL *sensu stricto*. Les grands agrégats pourraient constituer les «cylindroïdes» observables au microscope, tandis qu'une aggrégation encore plus poussée produirait les «nubécules» visibles à l'œil nu dans toute urine, peu de temps après son émission. Il est même possible qu'au moment même de son émission, l'urine ne renferme que de l'uromucoïde soluble au dépens duquel les formes ci-dessus décrites pourraient progressivement apparaître.

Les auteurs remercient Mlle C. JAUCOT de son aide technique.

J. P. VAERMAN et J. F. HEREMANS

Cliniques Universitaires St-Pierre, Service de Médecine interne A, Louvain (Belgique), le 11 mars 1959.

Summary

Concentrated normal urines were investigated by an immuno-electrophoretic technique using specific antiserum directed against uromucoid (= TAMM and HORSFALL's urinary mucoprotein).

A single precipitation line was observed, which, however, presented two distinct maxima. The faster antigen appeared to be situated between albumin and α_1 -globulin, while the slower antigen seemed to be an α_2 -globulin. Both antigens were immunologically identical with uromucoid, although the latter had been eliminated by salt precipitation from the urines used in this experiment.

The above findings can best be explained by assuming the occurrence of a polymer series of uromucoid, of which the lower members would be soluble in 0.58 M NaCl, while the higher terms would represent TAMM and HORSFALL's mucoprotein *sensu stricto*. It is suggested that cylindroids and nubecula represent visible forms of uromucoid.

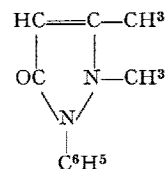
Végétativisation de l'œuf de l'oursin par la Phénazone

HERBST¹ a montré, chez l'oursin, que le lithium possède la remarquable propriété de déplacer l'équilibre entre les tendances ectodermiques et entomésodermiques en faveur de ces dernières. Ce phénomène est connu sous le nom de végétativisation ou végétalisation. A la suite des travaux de LINDHAL² montrant que le lithium exerce des effets inhibiteurs sur le métabolisme glucidique, différentes tentatives ont été faites en vue de provoquer la végétativisation à l'aide d'inhibiteurs de la glycolyse et de la respiration. Aucun effet végétativisant net n'a toutefois pu être obtenu. Récemment, HÖRSTADIUS³ a obtenu la végétativisation de moitiés animales isolées de l'œuf d'oursin, traitées par des dinitrophénols. L'œuf entier n'est que

très rarement végétativisé dans ces conditions. Le lithium reste ainsi pratiquement le seul agent efficace permettant d'induire la végétativisation dans l'œuf entier d'oursin.

Nous avons étudié les possibilités de provoquer la végétativisation par des méthodes nouvelles. La découverte d'un nouvel agent outre le fait qu'elle permet de préciser l'hypothèse mise en œuvre pour sa recherche présente en outre l'incontestable intérêt de permettre une analyse comparée des méthodes de végétativisation et d'apporter quelques éclaircissements tant sur le phénomène lui-même que sur le mode d'action des agents utilisés.

Nous avons orienté nos recherches en fonction des données expérimentales suivantes: des travaux antérieurs ont montré que l'animalisation, c'est-à-dire l'extension des territoires ectodermiques aux dépens des territoires entomésodermiques, peut être aisément obtenue en traitant les œufs entiers par des sels de zinc⁴ ou différents dérivés sulfoniques⁵. Or, ces agents présentent une affinité pour les groupes basiques des protéines. Parmi ceux-ci les groupes imidazoles présentent un intérêt particulier en raison de leur affinité marquée pour les ions zinc. Nous avons donc recherché si l'addition au milieu de culture de dérivés de l'imidazole pouvait entraîner des modifications spécifiques de la détermination embryonnaire. Les dérivés de l'imidazole ou diazole 1-3 étudiés jusqu'ici se sont montrés très toxiques. Par contre les dérivés du diazole 1-2 sont particulièrement intéressants et l'un de ceux-ci, la phénazone ou diméthyl-2-3 phényl-1 pyrazolone, dont nous donnons la formule ci-dessous, est capable d'induire la végétativisation des œufs entiers de *Paracentrotus lividus*. La phénazone plus connue sous le nom d'antipyrine est utilisée en thérapeutique pour ses propriétés antipyrétiques et analgésiques. Les concentrations efficaces sont 0,0275 M, 0,0250 M et 0,0225 M pour des traitements d'une durée de 18 à 20 h à la température de 19°C à 20°C. La végétativisation peut encore être obtenue avec des concentrations plus élevées, 0,0300 M par exemple, la durée du traitement étant diminuée. Avec des concentrations plus élevées enfin, le développement est bloqué au cours de la segmentation. Ce blocage est d'autant plus précoce que la concentration est plus élevée. Inversement l'activité de la phénazone disparaît rapidement lorsque la concentration diminue.



Phénazone (Formule de Knorr)

Les effets d'un traitement permanent et d'un traitement temporaire étant différents, nous les examinerons séparément.

Dans les cultures permanentes en présence de 0,0275 M de phénazone, le développement est arrêté au stade blastula. La gastrulation est ébauchée aux concentrations 0,0250 M, mais le développement de petits plutei n'est obtenu qu'avec des concentrations plus faibles de l'ordre de 0,0100 M. La végétativisation n'est pas observée dans ces conditions.

¹ C. HERBST, Z. wiss. Zool. 55, 446 (1892).

² P. E. LINDHAL, Acta zool. 17, 179 (1936).

³ S. HÖRSTADIUS, J. Embryol. exp. Morphol. 1, 327 (1953).

⁴ R. LALLIER, Arch. Biol. 66, 75 (1955).

⁵ R. LALLIER, Exp. Cell Res. 9, 232 (1955). – Pubbl. Staz. zool. Napoli 30, 185 (1957).