

After stimulation of the platelets by ADP and thrombin a marked change occurred in cell appearance and distribution (table). After 60 sec, there was centration of organelles (obvious in type 1 cells mainly), while after 120 sec the granules as well as the cytoplasm of type 1 cells became pale and the DTS broke up into microvesicles. In this way the reticular cells decreased markedly while the type 3 pale cells increased accordingly. The metallophilic type 2 cells, although not changing much in percentage, became a little paler. Their granules as well as the cytoplasm showed decreased electron opacity and the double membrane around many granules appeared to be interrupted.

Heavy metal impregnations performed at pH's of 1, 5.5, or 7 failed to stain any intracellular structures.

Discussion. Heavy metal impregnation is thought to cause electrostatic interaction between the ionized groups of macromolecules and the metal of the ionized metallic salt¹². The metals thus behave as cations which in suitable conditions may replace calcium in different loci.

The electron density of the heavy metals and the thickness of the sections allow the visualization of the polygonal tubular network traversing the cell, which is not apparent in routinely prepared ultrathin sections of platelets.

In other cells, metal impregnation at a pH of 3.5 is known to stain mitochondria and endoplasmic reticulum^{12,13}. The platelet DTS which originates from the endoplasmic reticulum of the parent megakaryocyte^{5,15} appears to retain the same staining properties. It is not clear why not all the cells exhibit the reticular network. Perhaps the natural heterogeneity of platelet structure is responsible.

The view that differences in platelet size, density, metabolic function and reaction to stimuli are caused by aging¹⁶, is now modified by the belief that heterogeneity may be acquired during platelet production^{14,17}. It is related to the parent megakaryocyte ploidy and is retained to a large extent throughout the platelet's life span. With the method used here, platelet subgrouping can be given additional, morphological expression.

The changes in structural and metal-binding characteristics of activated platelets are noteworthy. A similar change

from tubules to vesicles has been observed in a study of nerve endings with heavy metal impregnation¹².

Perhaps, as in nerve endings, in platelets too this change is part of a mechanism for the release of substances from the DTS.

The metallophilic cytoplasm, indistinct DTS and only moderate changes in staining characteristics after activation, suggest that the type 2 cells may have a functional mechanism differing from type 1 cells.

- 1 J.M. Gerrard, J.G. White, G.H.R. Rao and D. Townsend, *Am. J. Path.* 83, 283 (1976).
- 2 J.G. Gerrard, J.G. White and D.A. Paterson, *Thromb. Diath. haemorrh.* 40, 224 (1978).
- 3 T.C. Detwiler, I.F. Charo and R.D. Feinman, *Thromb. Diath. haemorrh.* 40, 207 (1978).
- 4 P. Massini, R. Kaser-Glanzmann and E.F. Luscher, *Thromb. Diath. haemorrh.* 40, 212 (1978).
- 5 J.G. White, *Am. J. Path.* 66, 295 (1972).
- 6 T. Daimon, V. Mizuhira and K. Uchida, *Histochemistry* 55, 271 (1978).
- 7 T. Sato, L. Herman, J.A. Chandler, A. Stracher and T.C. Detwiler, *J. Histochem. Cytochem.* 23, 103 (1975).
- 8 R. Yarom, J. Blatt, R. Gorodetzky, G.C. Robin, *Eur. J. clin. Invest.* 10, 143 (1980).
- 9 J.L. Costa, T.C. Detwiler, R.D. Feinman, D.L. Murray, C.S. Patlak and K.D. Petigrew, *J. Physiol.* 264, 297 (1977).
- 10 R.J. Skear, P.D. Peters and J.P. Emmines, *J. Cell Sci.* 20, 441 (1976).
- 11 I. Gwynn, P.M. Evans, B.M. Jones and J.A. Chandler, *Cytobios* 16, 97 (1976).
- 12 B. Droz, A. Rambourg and H.L. Koenig, *Brain Res.* 93, (1975).
- 13 G. Thiery and A. Rambourg, *J. Microsc. Biol. cell.* 26, 103 (1976).
- 14 J.M. Paulus, *Blood* 46, 321 (1975).
- 15 O. Behnke, *J. Ultrastruct. Res.* 24, 412 (1968).
- 16 S. Karapatkin, *A. Rev. Med.* 23, 101 (1972).
- 17 D.G. Penington, K. Streatfield and A.F. Roxburgh, *Br. J. Haemat.* 34, 639 (1976).

Localisation ultrastructurale de l'œstradiol et du moxestrol dans les cellules gonadotropes du rat par immunocytologie après cryo-ultramicrotomie: caractérisation de la spécificité hormonale¹

Ultrastructural localization of estradiol and moxestrol in the gonadotropic cells of rat by immunocytology after cryo-ultramicrotomy: evidence for hormonal specificity

G. Morel, J.P. Raynaud et P.M. Dubois

Laboratoire d'Histologie et Embryologie, Faculté de Médecine Lyon-Sud B.P. 12, F-69600 Oullins (France), et Centre de Recherche Roussel-Uclaf, F-93230 Romainville (France), 10 avril 1980

Summary. Estradiol (E₂) was specifically localized by immunocytochemistry in the cytoplasm and in the nucleus of the gonadotropic cells. The immunocytochemical reaction was not observed after injection of moxestrol, but it was not modified by injection of testosterone, progesterone, or dexamethasone. These data suggest that E₂ might be bound to a high-affinity binding-site which could also have a hormonal specificity.

La localisation d'un stéroïde par immunocytochimie ultrastructurale après cryo-ultramicrotomie est possible dans un tissu hétérogène tel que l'hypophyse^{2,3}. Les variations des hormones sexuelles après gonadectomie^{4,5} et le déplacement de ces hormones par des agonistes et antagonistes⁶ font penser que ces molécules sont fixées à un site de liaison. Dans le but de caractériser la spécificité de cette liaison nous étudions la spécificité hormonale.

Matériels et méthodes. Des rats femelles de souche Wistar (IFFA-Credo, France) ont été réparties en 2 groupes par lots de 2 à 3 animaux. Les animaux du premier groupe sont des rattees de 17 jours, qui reçoivent toutes une injection de 1 mg d'œstradiol (Sigma) (E₂). Le premier des 13 lots sert de témoin, les 12 autres lots subissent une autre injection de doses croissantes (0,5; 1; 5 et 10 mg/rat) soit de progestérone (Sigma) (P), de testostérone (Sigma) (T) ou de

déxaméthazone (Sigma) (DXM). Le deuxième groupe, composé de ratte adultes ovariectomisées en dioestrus 15 jours auparavant, reçoit une injection de 500 µg de moxestrol (11-métoxy-éthynyl-œstradiol). Le premier des 4 lots sert de témoin et les 3 autres lots reçoivent respectivement et simultanément au moxestrol, 1 mg soit de P, de T ou de DXM.

Les animaux sont sacrifiés 1 h après les injections par décapitation entre 08.00 et 09.00 h. L'hypophyse prélevée est fixée dans le glutaraldéhyde 2,5% en solution dans un tampon mono-di-phosphate 0,1 M, pH 7,4. Après lavage dans le tampon, les fragments sont post-fixés pendant 1 h dans le tétraoxyde d'osmium en solution à 1% dans le même tampon. Après un nouveau lavage, les fragments de tissus sont incubés dans le sucrose 0,4 M pendant 30 min puis congelés selon le protocole décrit précédemment³. Les coupes sont obtenues à une température de -120 °C sur un ultramicrotome Ultratome III LKB équipé du cryokit selon la technique de Tokuyasu⁶.

Lors de la réaction immunocytochimique 2 anticorps ont été utilisés, un sérum anti-œstradiol (réf.3341) et un sérum anti-moxestrol (réf.3171). Ces sérums ne présentent pas de

réaction croisée avec les stéroïdes utilisés et les métabolites de l'E₂. Le sérum anti-moxestrol ne présente aucune réaction croisée avec l'E₂. Le complexe antigène-anticorps obtenu après incubation de la coupe 10 min sur une goutte de sérum, est révélé en utilisant le complexe peroxydase-antiperoxydase préparé selon Sternberger⁷. La réaction immunocytochimique est révélée par le 4-chloro-1-naphtol (ICN Pharmaceutical Inc., Plainview, N.Y.) selon le protocole précédemment décrit⁸.

Les coupes sont contrastées par l'acétate d'uranyl et examinées au microscope électronique Siemens Elmiskop 1 A.

Les résultats sont exprimés suivant la dilution de l'anticorps. Les anti-sérums sont dilués, selon une gamme de dilution d'ordre 10, jusqu'à ce que la réaction immunocytochimique disparaisse dans les cellules. Les résultats sont donnés comme la dernière dilution qui permet d'obtenir encore une réaction immunocytochimique (MDA). La valeur de MDA a toujours été déterminée par l'examen des coupes d'hypophyses de 2 à 3 animaux.

Résultats et discussion. Dans les conditions de congélation utilisées ici, des cristaux de petite taille seulement sont visibles (figure 1). Plusieurs types de cellules peuvent s'observer du fait de la taille, de l'aspect, de la distribution des grains de sécrétion comparables à ce que l'on observe après inclusion dans les résines époxy: les cellules gonadotropes se reconnaissent à leur double population de grains de sécrétion. Cette population cellulaire a pu être caractérisée par immunocytochimie après cryo-ultramicrotomie².

Quel que soit l'anticorps utilisé la réaction immunocytochimique a toujours le même aspect (figure 1). La localisation du complexe antigène-anticorps est marquée par de petits grains denses aux électrons, arrondis, réguliers, de 30 nm de diamètre minimum.

L'E₂ peut être localisé dans les cellules gonadotropes à la fois dans le cytoplasme et le noyau (figure 1, encart). Dans le cytoplasme la réaction immunocytochimique montre l'E₂ en dehors de tous les organites cytoplasmiques; parfois il se rencontre autour des grains de sécrétion. Dans le noyau, il semble se localiser préférentiellement dans l'euchromatine au voisinage de l'hétérochromatine. Ces résultats excluent la possibilité d'un déplacement du stéroïde, car celui-ci se ferait au hasard et l'hormone se rencontrerait également dans les organites. La localisation ainsi obtenue confirme les résultats autoradiographiques^{9,10}. De plus des récepteurs à l'E₂ ont été décrits dans l'hypophyse de rat à la fois dans le cytosol et le noyau¹¹.

L'administration d'un stéroïde de synthèse: le moxestrol, permet sa localisation par immunocytochimie dans les mêmes compartiments cellulaires que l'E₂, c'est-à-dire la matrice cytoplasmique et le noyau. Dans le noyau il se retrouve dans l'euchromatine au voisinage de l'hétérochromatine. Or dans ce cas l'E₂ n'est plus décelé. Il est connu que le moxestrol déplace par compétition l'E₂ de son site de liaison. Or le moxestrol présente une affinité vis-à-vis du

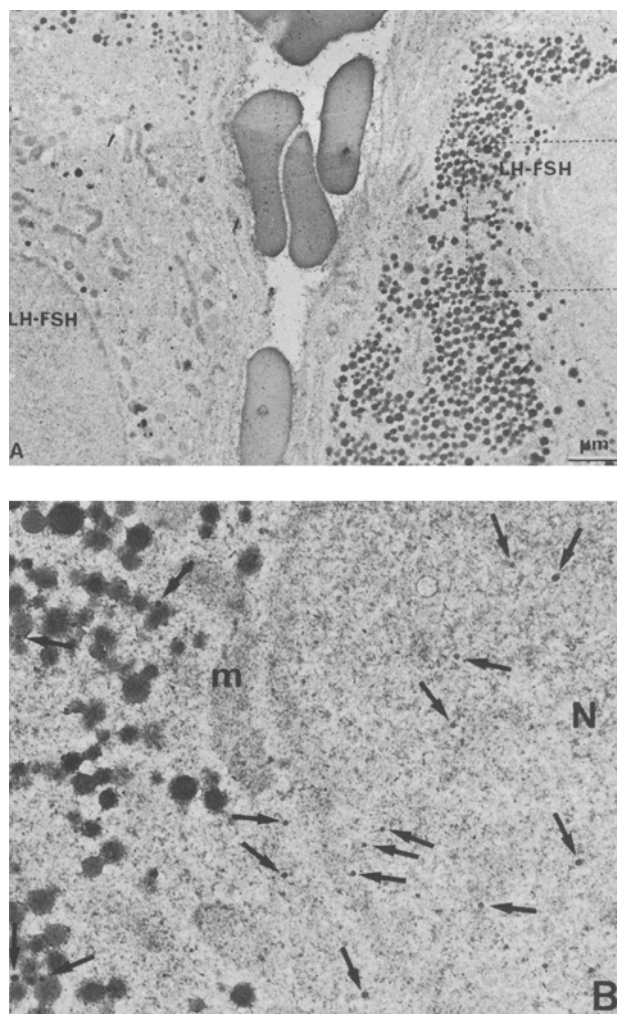


Fig. 1. Localisation ultrastructurale de l'œstradiol dans l'antéhypophyse. a Aspect ultrastructural du tissu hypophysaire après cryo-ultramicrotomie (LH-FSH: cellules gonadotropes; GH: cellules somatotropes). b Localisation de l'E₂ par immunocytochimie (←) dans le noyau et la matrice cytoplasmique des cellules gonadotropes (N, noyau; m, mitochondrie).

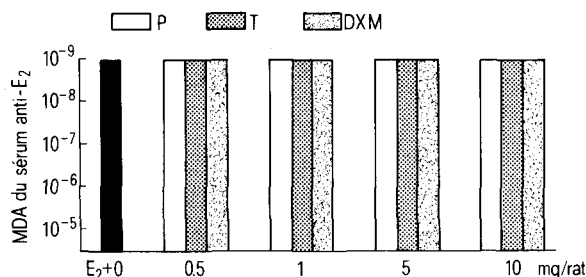


Fig. 2. Spécificité hormonale de la liaison de l'E₂. Des injections croissantes de P, T ou DXM à des ratte ayant reçu 1 mg d'E₂ ne modifient pas la dilution maximale du sérum (MDA) anti-E₂.

site de liaison supérieure à celle de E_2 ¹² et le déplace compétitivement du récepteur hypophysaire¹³. Une molécule de synthèse dont l'affinité vis-à-vis du site de liaison est supérieure à celle de l' E_2 déplace l' E_2 . Par contre, s'il existe une spécificité hormonale, les autres hormones stéroïdes ne doivent pas entraîner de modification de la fixation de la molécule d' E_2 . Ceci est montré par la figure 2. La MDA n'est pas modifiée par l'injection de doses croissantes d'autres stéroïdes qui possèdent leur propre site de liaison¹⁴⁻¹⁶. De même la MDA du sérum anti-moxestrol est de 10^{-5} , celle-ci n'est pas modifiée par l'administration de P, T ou DXM, confirmant ainsi la spécificité hormonale et la fixation du moxestrol sur le site de liaison de l' E_2 . Cependant l'utilisation de la MDA ne doit pas être assimilée à une quantification des résultats. Les valeurs obtenues n'ont pas de signification absolue. Cependant la détermination de cette valeur est intéressante car elle permet d'apprécier les variations relatives d'un stéroïde dans une cellule cible.

En conclusion, l'immunocytochimie après cryo-ultramicrotomie permet de localiser des stéroïdes endogène, exogène ou de synthèse dans un tissu hétérogène tel que l'hypophyse. La MDA permet d'apprécier des affinités relatives et les caractéristiques des sites de liaison des hormones tel que la spécificité hormonale.

- 1 Ce travail a bénéficié d'une aide de l'I.N.S.E.R.M., ATP 587890 contrat 48 (P.M. Dubois).
- 2 P.M. Dubois, G. Morel, M.G. Forest et M.P. Dubois, *Horm. Metab. Res.* 10, 250 (1978).
- 3 G. Morel, M.G. Forest et P.M. Dubois, *C. r. Acad. Sci. (Paris)* 288, 1667 (1979).
- 4 J. Rabii et W.F. Ganong, *Neuroendocrinology* 20, 270 (1976).
- 5 G. Morel, P. Dubois, D. Lecaque, J. Secchi et J.P. Raynaud, *Cancer Treat. Report* 63, 1148 (1979).
- 6 K.T. Tokuyasu, *J. Cell Biol.* 57, 551 (1973).
- 7 L.A. Sternberger, P.H. Hardy, J.J. Cuculis et H.G. Meyer, *J. Histochem. Cytochem.* 18, 315 (1970).
- 8 J.Y. Li, M.P. Dubois et P.M. Dubois, *Cell Tissue Res.* 181, 545 (1977).
- 9 W.E. Stumpf, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 92, 23 (1968).
- 10 W.E. Stumpf, dans: *Receptors and mechanism of action of steroid hormones*, p.41. Ed. J.R. Pasqualini. M. Dekker Inc., New York 1976.
- 11 K.S. Korach et T.G. Muldoon, *Endocrinology* 92, 322 (1973).
- 12 J.P. Raynaud, P. Martin, M.M. Bouton et T. Ojasoo, *Cancer Res.* 38, 3044 (1978).
- 13 T. Ojasoo et J.P. Raynaud, *Cancer Res.* 38, 4186 (1978).
- 14 J. Kato et T. Onuchi, *Endocrinology* 101, 920 (1977).
- 15 O. Naess, V. Hansson, O. Djoeseland et A. Attramadal, *Endocrinology* 97, 1355 (1975).
- 16 B.S. McEwen, dans: *Glucocorticoid hormone action*, p.467. Ed. J.D. Baxter et G.G. Rousseau. Springer, Berlin 1979.

Thyroid hormones and cathepsin D activity in the rat liver, kidney and brain

J.G. Satav and S.S. Katyare

Biochemistry and Food Technology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Bombay 400085 (India), 25 February 1980

Summary. The effect of thyroidectomy and subsequent treatment with tri-iodothyronine (T_3), as well as that of thyrotoxicosis, was examined on cathepsin D activity in the rat liver, kidney and brain. Thyrotoxicosis resulted in a generalized increase in the enzyme activity in the 3 tissues; the effect of other thyroidal states was diverse and tissue-specific.

The role of thyroid hormones in regulating microsomal protein synthetic activity and mitochondrial energy metabolism has been extensively studied^{1,2}. In recent years, however, it has become increasingly apparent that thyroid hormones may also influence lysosomal enzyme activities³⁻⁶.

Earlier studies from our laboratory indicated a tissue-specific regulatory role for thyroid hormones with respect to energy metabolism in mitochondria⁷ and turnover of their protein components⁸. It was therefore of interest to see whether a similar effect could also be seen in the case of a typical lysosomal enzyme, viz. cathepsin D. Results of these studies are summarized below.

Materials and methods. Male albino rats of Wistar strain were used throughout these experiments. Thyroidectomy was performed on weanling male rats (20-22 days old, 30-35 g b.wt) and the animals were allowed to grow for 8-10 weeks; a periodic record of their body weights and basal metabolic rates was kept. Only those animals showing considerable decrease in body weight (30-35% decrease) and basal metabolic rate (35-40% decrease) were used for further studies. Treatment of the thyroidectomized animals with tri-iodothyronine (T_3) (20 µg/100 g b.wt) was as described previously⁹. Thyroidectomized animals treated with T_3 were sacrificed 48 h after hormone administration. Thyrotoxicosis was induced experimentally by giving repeated doses of 200 µg T_3 per day s.c. for 5 days to rats weighing between 150-160 g¹⁰; the animals were sacrificed on the 6th day.

Liver and kidney homogenates (10% w/v) were made in 0.25 M sucrose containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 1 mM EDTA⁷. Of the brain a 20% homogenate (w/v) was made in 0.3 M mannitol containing 0.1 mM EDTA, pH 7.4⁷.

Free and total cathepsin D activities were determined according to the method of Gianetto and De Duve¹¹ at pH 3.8, using denatured hemoglobin as the substrate. The Folin-positive material released in the supernatant was estimated according to the method of Spies¹².

For estimation of the free pool size, separate aliquots of homogenates were deproteinized with trichloroacetic acid and the Folin-positive material released in the supernatant was determined as described above¹². The values are expressed in terms of µg tyrosine/g tissue. Protein was estimated by the method of Lowry et al¹³. Student's t-test was used to determine statistical significance of differences between means.

Results and discussion. Results on the cathepsin D activities in the liver, kidney and brain, as influenced by the thyroid status of the rat, are shown in table 1. It can be noted that the free cathepsin D activity in the liver decreased significantly (43% decrease) after thyroidectomy, in agreement with the report of De Martino et al.⁴; and subsequent treatment with T_3 resulted in restoring the free activity to the level of normal euthyroid animals. In fact, a slight increase over the normal value was evident, which, however, was not statistically significant. Thyrotoxicosis caused a significant elevation (200% increase) of the free cathepsin D