

The hypertrophy of fibre types 1, 2 and 6 was preserved for more than 3 months.

Extraocular muscles include muscle fibre types which are quite different from those to be found in common skeletal muscles. A long-lasting hypertrophy is shown by fibres which are considered to be tonic muscle fibres (types 2 and 6), subsequent to denervation. In particular, type 2 fibres react in a way which is known to be typical

of avian slow tonic fibres^{7,8}. The transient hypertrophy of the phasic muscle fibres which are comparatively rich in mitochondria (type 5) resembles the reaction described for diaphragm muscle fibres^{4,6}. The results confirm the distinction made between no less than 6 different fibre types in extraocular muscles.

Summary. Extraocular muscles show a striking hypertrophy subsequent to denervation. This is due to hypertrophy of special histochemically characterized muscle fibre types.

G. ASMUSSEN and A. KIESSLING⁹

*Carl-Ludwig-Institute of Physiology,
Karl-Marx-University, Liebigstrasse 27,
701 Leipzig (German Democratic Republic, DDR),
5 May 1975.*

⁷ T. P. FENG, H. W. JUNG and W. Y. WU, *Acta physiol. sin.* 25, 304 (1962).

⁸ O. M. SOLA, D. L. CHRISTENSEN and A. W. MARTIN, *Expl. Neurol.* 41, 76 (1973).

⁹ We used a cryostat of the Pathological Institute of Karl-Marx-University and we acknowledge the help of Dr. F. WOHLRAB of this institute.

Richesse en lysosomes des préparations de synaptosomes du mésencéphale de rat Lysosome-Rich Synaptosomal Preparations from Rat Mesencephalus

Depuis la découverte des lysosomes par de DUVE et al. en 1955¹ ces organites ont fait l'objet de nombreux travaux qui ont permis d'en préciser leurs caractères structuraux et biochimiques. Ces caractères sont réunis dans l'ouvrage de DINGLE².

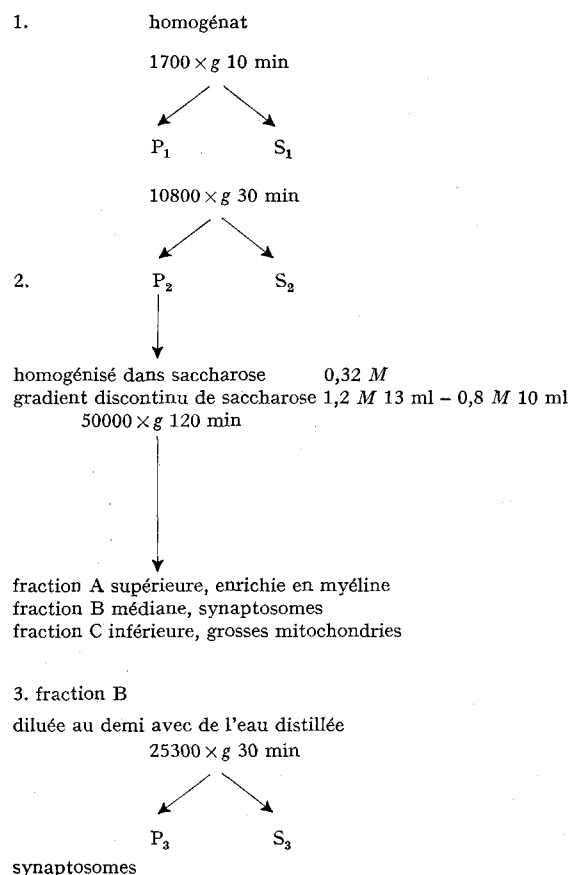
Les lysosomes peuvent être identifiés grâce à des «marqueurs» enzymatiques représentés par des hydrolases considérées comme leur étant spécifiques, notamment: phosphatase acide (EC 3.1.3.2.), β glucuronidase (EC 3.2.1.31.), ribonucléase (EC 2.7.7.16.).

Au cours de techniques de fractionnement des constituants cellulaires, les lysosomes, par leur taille et leur densité, sont le plus souvent associés aux mitochondries. D'autre part, les synaptosomes préparés en gradient discontinu, selon la méthode décrite par GRAY et WHITTAKER³ montrent en microscopie électronique une «contamination» importante par les mitochondries. Ces deux phénomènes nous ont amené à étudier l'importance de la «contamination» par les lysosomes dans les différentes fractions décrites au cours de la séparation des synaptosomes, en mesurant l'activité phosphatase acide et en effectuant des photomicrographies au microscope électronique.

Matériel et méthodes. 1. Séparation des fractions. Des rats Sprague-Dawley, de 180–200 g, sont sacrifiés par décapitation, sans anesthésie. Après dissection de la boîte crânienne, on sépare les mésencéphales par la technique décrite par GLOWINSKY⁴. Les synaptosomes sont obtenus suivant la technique de GRAY et WHITTAKER³ modifiée par ISRAEL et FRACHON-MASTOUR⁵.

Les mésencéphales sont broyés à l'aide de l'appareil de Potter-B. Braun Melsungen, verre-teflon à 840 tours/min avec 10 aller-retours du piston (clearance 0,25 mm) pendant 1 min dans une solution de saccharose 0,32 M (homogénat à 10% p/v).

Les différentes fractions sont séparées selon le schéma suivant:



P₁, P₂, P₃ représentent les culots de centrifugation; S₁, S₂, S₃ représentent les surnageants.

Activité phosphatase acide au cours des différentes étapes de la séparation des synaptosomes du mésencéphale de rat

Fractions	Activité totale (mU/ml)	Protéines totales (mg/ml)	Activité spécifique (mU/mg)	Captation du GABA-I ¹⁴ C (nM/mg/min)
Fraction P ₂	321	9,80	32,75	0,70
Fraction A	29	1,95	14,87	0,00
Fraction C	125	3,90	32,05	0,63
Fraction S ₃	17	0,49	34,69	0,00
Fraction P ₃	150	5,00	30,00	2,50

Toutes les opérations sont effectuées entre 0 et 4°C. La fraction P₃ est reprise par une solution de saccharose 0,32 M. A chacune des 5 fractions P₂, A, C, P₃, S₃, on ajoute de la digitonine à 1% qui permet de lyser les particules et en particulier les lysosomes⁶. On réalise ainsi une homogénéisation de chaque fraction et une libération des enzymes particulières, notamment lysosomales.

2. Mesure de l'activité phosphatase acide. Cette mesure a été effectuée dans chacune des fractions par la méthode de ANDESH et SZCYPINSKI⁷ qui utilise le paranitrophénylphosphate de sodium comme substrat.

3. Mesure de la captation de l'acide (I-¹⁴C) γ -aminobutyrique (GABA) (activité spécifique 21 mCi/mM) selon la technique de LEVI et al.⁸. Cette détermination a pour objet d'estimer l'enrichissement en synaptosomes de chaque fraction. 4. Dosage des protéines selon la méthode de LOWRY⁹.

Les résultats sont exprimés en activité spécifique de la phosphatase acide, c'est-à-dire mU/mg protéines, et en activité totale, soit mU/ml de solution. La captation du GABA marqué est exprimée en nmole de GABA radioactif capté/mg protéines/min.

Résultats (Figure 1). L'activité totale en phosphatase acide de la fraction P₂ se distribue inégalement dans les différentes fractions subséquentes du gradient discontinu. Les fractions A et S₃ sont très pauvres en activité enzymatique. Les fractions C et P₃ sont au contraire très

riches en activité enzymatique. La fraction B n'est pas représentée puisqu'elle a été fragmentée, son activité totale étant répartie entre les fractions S₃ et P₃. La richesse en protéines des fractions n'est pas la même, les activités spécifiques ne sont pas superposables aux activités totales.

La captation du GABA par la fraction synaptosomale (P₃) est environ 4 fois celle de la fraction mitochondriale, ce qui confirme les résultats de LEVI et al.⁸. La présence de lysosomes exprimée par l'activité spécifique phosphatase acide (Tableau) est presque aussi importante dans la fraction II (culot C des mitochondries) que dans la fraction IV (culot P₃ synaptosomes). La fraction IV est 9 fois plus riche en activité phosphatase acide que la fraction III (surnageant S₃). La dernière centrifugation (25 300 $\times g$ de la fraction B) permet la sédimentation des synaptosomes et d'une importante partie des lysosomes. Il est important de souligner que les surnageants étant pauvres en activité phosphatase acide, les différentes centrifugations permettent de conserver l'intégrité des lysosomes.

Les photomicrographies de la fraction P₃ synaptosomale obtenues au microscope électronique après double fixation classique par le glutaraldéhyde et le tétroxyde d'osmium montrent parmi des synaptosomes et des mitochondries la présence de vésicules intra et extra synaptosomales de tailles variables qui évoquent des lysosomes intacts (Figure 2).

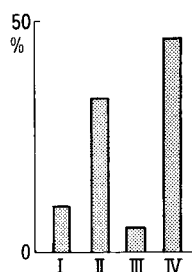


Fig. 1. Pourcentage d'activité phosphatase acide des différentes fractions rapportées à l'activité totale de la fraction P₂. I, fraction A; II, fraction C; III, fraction S₃ (surnageant de 25300 $\times g$); IV, fraction P₃ (culot de 25300 $\times g$).

¹ C. DE DUVE, B. C. PRESMAN, R. C. GIANETTO, R. WATTEAUX et F. APPELMANS, *Biochem. J.* 60, 604 (1955).

² J. T. DINGLE, *A Laboratory Handbook* (North Holland Publishing, Amsterdam 1972).

³ E. G. GRAY et V. P. WHITTAKER, *J. Anat.* 96, 79 (1962).

⁴ J. GLOWINSKI et L. L. IVERSEN, *J. Neurochem.* 13, 655 (1966).

⁵ M. ISRAEL et P. FRACHON MASTOUR, *Archs Anat. microsc.* 59, 383 (1970).

⁶ L. E. A. RODRIGUES et M. C. SOARES, *Revta bras. Med. Biol.* 5, 6 (1972).

⁷ M. A. ANDESH et A. J. SZCYPINSKI, *Am. J. clin. Path.* 77, 571 (1947).

⁸ G. LEVI, A. BERTOLLINI, J. CHEN, M. RAITERI, *J. Pharm. exp. Ther.* 188, 429 (1974).

⁹ O. H. LOWRY, M. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1961).

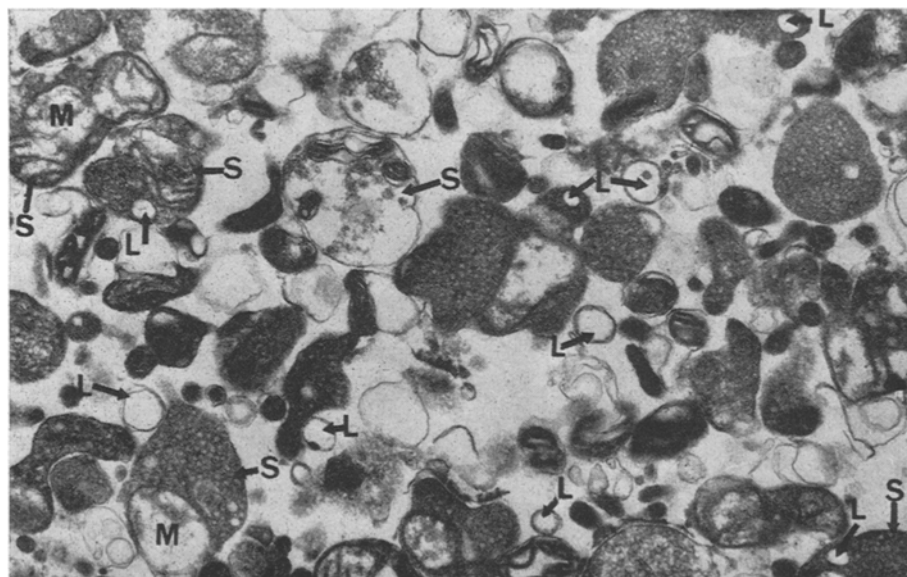


Fig. 2. Photomicrographie grossissement du sédiment de 25000 g sans traitement par la digitonine. S, synaptosomes; L, lysosomes; M, mitochondries. $\times 40\,000$.

Discussion. Quelle que soit la méthode utilisée pour la préparation des synaptosomes on avait constaté un certain degré de contamination par les mitochondries de différentes tailles. La présence de lysosomes n'avait pas été mentionnée jusqu'ici. Nos résultats montrent une contamination importante de la fraction synaptosomale par des lysosomes intacts.

Summary. Subcellular fraction, enriched with synaptosomes, obtained from rat brain has been found contami-

nated by lysosomes, as evidenced by the high content of acid phosphatase, their biochemical marker.

J. C. KOUYOUMDJIAN, L. E. A. RODRIGUES,
M. F. BELIN et P. GONNARD

Departement de Biochimie, C.H.U. Henri Mondor,
F-94010 Creteil Cedex (France), 26 mai 1975.

Reduction of Hypoxia-Induced Disturbances by Previous Treatment with Benserazide and L-Dopa in Rats

Improvement of the performances during hypoxia after treatment by an inhibitor of dopa-decarboxylase (benserazide) and L-Dopa strongly suggests a role of catecholamines¹. Central catecholamines may alter either cerebral blood flow and/or vegetative responses induced by hypoxia, since these catecholamines are known to inhibit central pressor effects provoked by stimulation of carotid sinus^{2,3}. In this study, we attempted to determine whether hypoxia causes any modification of cerebral blood flow estimated by rheoencephalography, of spontaneous motility, and level of cerebral catecholamines.

Methods. Long Evans female rats, 3 months old, were used. Every measurement was performed in an hypobaric chamber. Each parameter (pO_2 , pCO_2 , pH, rheoencephalogram, motility, central dopamine and norepinephrine) was registered at 760 mm Hg, then at a pressure of 500 mm Hg (4200 m), later on at 300 mm Hg (7300 m)

and finally when back to atmospheric pressure. Each experiment started 1 h after administration of L-Dopa. 2 groups were studied: a control one (NaCl 0.9%) and a treated one (RO 4 4.602: 50 mg/kg i.p., L-Dopa 100 mg/kg i.p. 1 h later). Each animal's motility was recorded by a photoelectric actimeter. Cerebral flow was registered in anaesthetized rats (pentobarbitone 35 mg/kg i.p.) by means of impedance plethysmography with 2 electrodes fixed on temples. Simultaneously, heart rate was recorded (ECG); pO_2 , pCO_2 , pH were registered in arterial aortic blood of anaesthetized rats.

Results and discussion. In control animals, measurements of blood parameters showed that the diminution of pressure chosen (300 mm Hg) induced a sufficient hypoxemia (45 mm Hg) without any modification of pCO_2 . Therefore, a normocapnic hypoxemia has been realised and an influence of possible changes of CO_2 on cerebral blood flow seems to be ruled out. But it is important to notice that the blood gas values are not changed after treatment by benserazide and L-Dopa. Thus, the hypothesis of an interaction of the treatment upon animal's ventilation can be rejected.

In the control group, hypoxia induced an elevation of the rheoencephalogram without any change in heart rate. The return to atmospheric pressure provoked an increase of pO_2 and a decrease of rheoencephalogram which reached a lower value than the initial one.

Pretreated animals (benserazide + L-Dopa 100 mg/kg i.p.) show very different hemodynamic modifications (Figure 1): these animals' rheoencephalograms were unchanged. Therefore, administration of benserazide and L-Dopa appeared to abolish interactions of hypoxia on cerebral blood flow. It seems to work as if L-Dopa inhibited the chemoreceptors^{2,3}. Administration of benserazide and L-Dopa induced a diminution of motility, which is not observed^{4,5} after treatment by benserazide alone. A reduction of motility is also provoked by hypoxia alone. The decrease in the reduction of motility after hypoxia in pretreated rats (benserazide and L-Dopa) might be ascribed to the central effects of L-Dopa¹ (Figure 2).

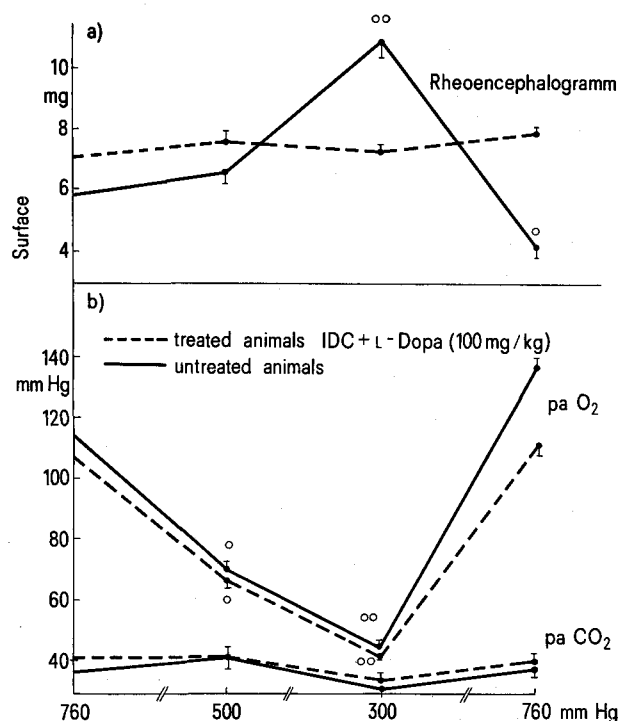


Fig. 1. a) surface of rheoencephalograms $\pm$ SE (mg of paper) measured at variable pressures (760, 500, 300 mm Hg and back to 760 mm Hg) (10 animals per group). b) pO_2 and pCO_2 at the same different values of pressure. $^{\circ}p < 0.05$. $^{\circ\circ}p < 0.01$ (statistical significance calculated by appared couple method and *t*-test inside).

¹ R. BROWN, J. N. DAVIS and A. CARLSSON, *J. pharmac. Pharmacol.* 25, 412 (1973).

² H. SCHMITT, H. SCHMITT and S. FENARD, *Eur. J. Pharmac.* 17, 293 (1972).

³ A. M. WATANABE and P. V. CARDON, *Circulation* 44, 93 (1971).

⁴ M. GOUGET, P. SIMON, R. CHERMAT and J. P. BOISSIER, *J. Pharmac.*, Paris 5, 387 (1974).

⁵ F. BOISMARE, J. LORENZO, P. LECHAT and N. LETTERON, *J. Pharmac. Fr.* 5, 5 (1974).