

Table IV. Effect of phentolamine or phenoxybenzamine pretreatment on tolbutamide-induced hypoglycemic response in the rat

Treatment	Dose (mg/kg)	Blood sugar (mg/100 ml/1½ h)	p-values
Controls	—	93 ± 3.3 (14)*	—
Na-tolbutamide (s.c.)	100	63 ± 7.5 (16)	< 0.001
Phentolamine ^b (i.p.)	20	79 ± 2.3 (14)	< 0.01
Phenoxybenzamine ^b (i.p.)	5	86 ± 4.0 (8)	N.S.
Phentolamine ^b (i.p.)	20		
+		67 ± 4.3 (16)	N.S.
Na-tolbutamide (s.c.)	100		
Phenoxybenzamine ^b (i.p.)	5	62 ± 1.3 (8)	N.S.
+			
Na-tolbutamide (s.c.)	100		

* Mean ± SE. Number in parentheses indicate number of rats.

^b Injected 30 min before Na-tolbutamide. Blood was collected 1½ h later.

Table V. Effect of Oxprenolol on tolbutamide-induced hypoglycemic response in the rat

Treatment	Dose (mg/kg)	Blood sugar (mg/100 ml/1 h)	p-values
Controls (saline)	—	86 ± 3.1* (8)	
Oxprenolol (i.p.) ^b	20	84 ± 3.5 (8)	N.S.
Na-tolbutamide (s.c.)	100	53 ± 2.1 (8)	< 0.001
Oxprenolol (i.p.) ^b	20		
+		50 ± 1.7 (8)	< 0.001
Na-tolbutamide (s.c.)	100		

* Mean ± SE. Number in parentheses indicates the number of rats.

^b Injected 30 min before Na-tolbutamide administration. Blood was collected 1 h after Na-tolbutamide injection.

Oxprenolol did not produce any significant change in the hyperglycemia produced by streptozotocin. Both these procedures did not have any effect on the acute (24 h) or maintenance of hyperglycemic response (7 days) following streptozotocin injections. Both these results seem to indicate very little involvement of sympathetic nervous system in the streptozotocin-induced hyperglycemia in the rat.

The hypoglycemic response of tolbutamide and phenformin in normal and 6-OHD treated rats is shown in Table III. There was no significant difference between the hypoglycemic response observed in the 2 groups. Hypoglycemic response to tolbutamide was also unaltered by pretreatment of rats with α -adrenergic blocking agents such as phentolamine and phenoxybenzamine (Table IV), or β -adrenergic blocking agents such as Oxprenolol (Table V). Our results with Oxprenolol are in accordance with the observations made by BORN and SPRATTO²¹ using propranolol. These authors have shown that β -adrenergic blocking agents have significant effect on blood glucose response in the mouse but practically no effect in the rat. They have therefore emphasized that a species difference exists between the rat and the mouse with respect to the action of β -adrenergic blocking agents on blood glucose response. These observations seem to lend support to our inability to show any significant effect of α - and β -adrenergic blocking agents on the hypoglycemia produced by oral hypoglycemic agents, and any significant difference in the development and maintenance of hyperglycemia between normal and sympathectomized animals.

²¹ C. K. BORN and C. R. SPRATTO, Fedn. Proc. 30, 315 (1971).

Evolution des prostates rudimentaires d'*Ellobius lutescens* (Microtinae) en culture organotypique; action des androgènes¹

Development of the Rudimentary Prostates of *Ellobius lutescens* (Microtinae) in Organ Culture; Effects of Androgens

Y. STEFAN² et J. MEDILANSKI

Laboratoire d'Endocrinologie, 154, route de Malagnou, CH-1224 Chêne-Bougerie, Genève (Suisse), 16 janvier 1976.

Summary. The structure of the rudimentary prostates of *Ellobius lutescens* is maintained intact after 6 days of organotypic culture in the absence of male hormones. Comparison with controls even shows a noticeable increase in the size of the epithelial cells. Adding male hormones to the culture medium does not modify the morphology of adult prostates, while it induces a sharp stimulation of immature prostates. In accordance with our previous results, these experiments show that the prostates of *Ellobius lutescens* lose their sensitivity to androgens after puberty.

L'état rudimentaire des prostates que nous avons décrites chez *Ellobius lutescens* atteint d'oligospermie³, nous a incités à entreprendre des essais de stimulation de celles-ci par des traitements aux androgènes. In vivo, aucun traitement par des doses fortes ou physiologiques de propionate de testostérone n'a réussi à modifier la structure des prostates d'*Ellobius* entiers, adultes ou impubères^{4,5}. Ce n'est que chez des animaux castrés à l'état immature (à l'âge de 4 à 5 semaines) et traités pendant un mois par du propionate de testostérone que l'on observe une nette stimulation des cellules épithéliales prostatiques aboutissant à une significative augmentation du volume des prostates⁵. L'ablation précoce des testicules favorise donc la réponse des prostates aux andro-

gènes. Ainsi, pour soustraire les prostates aux diverses influences de l'organisme, nous avons eu l'idée de nous placer dans les conditions de la culture organotypique. Les travaux de FEYEL-CABANES et al.⁶, portant sur des organocultures de rats castrés traités par des androgènes, ayant montré qu'une restimulation de l'épithélium prostatique pouvait être obtenue in vitro, nous ont encouragés à entreprendre de telles expériences sur *Ellobius*. Nous rapportons ici nos observations histologiques concernant l'évolution des prostates d'*Ellobius* adulte et impubère, en culture organotypique, en présence ou en l'absence d'androgènes.

Matériel et méthodes. Animaux: environ 150 *Ellobius*, adultes et impubères (âges de 5, 6, 7 ou 8 semaines) pro-

venant de notre élevage, dont les conditions ont été décrites antérieurement³, ont servi à cette étude. Par ailleurs, nous avons castré 12 rats âgés de 6 à 7 semaines; 15 jours après castration leurs prostates ont été mises en culture dans les mêmes conditions que celles d'*Ellobius* et soumises à un traitement à la testostérone.

Conditions de culture: les animaux sont tués par décapitation; les prostates sont immédiatement prélevées avec toutes les précautions d'asepsie et lavées dans une solution physiologique stérile. Les organes sont découpés rapidement en fragments d'environ 1 mm³. Pour chaque animal les fragments de prostate sont subdivisés en 3 lots: le premier sert de témoin hors culture et est fixé au Bouin; le deuxième lot est mis en culture sans être soumis à un traitement hormonal, servant ainsi de témoin

en culture; le troisième lot sera soumis en culture à l'action des androgènes. Les cultures sont effectuées dans des cuves de «Conway», où l'humidité est maintenue grâce à du coton imbibé d'eau distillée stérile. Les

¹ Ce travail a pu être réalisé grâce au Fonds n° 3919072 attribué par le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique et à la contribution du Fonds Klaraz.

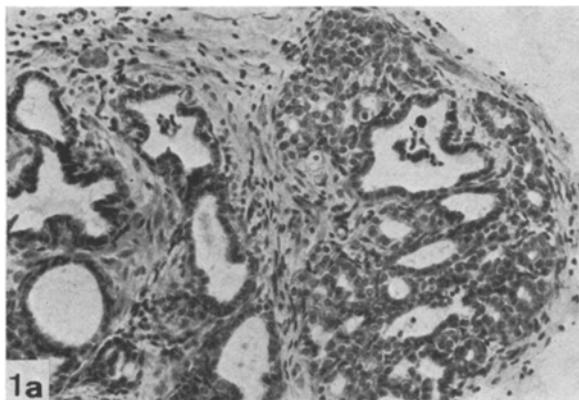
² Adresse actuelle: Institut d'Histologie et d'Embryologie, Ecole de Médecine, CH-1211 Genève 4, Suisse.

³ Y. STEFAN, Archs Anat. Hist. Embr. exp. 40, 153 (1967).

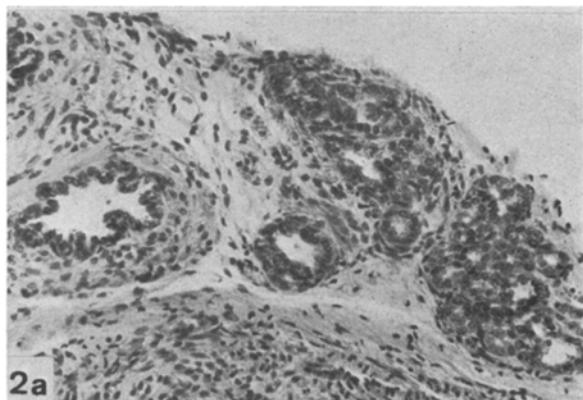
⁴ Y. STEFAN et TH. STEIMER, C. r. Séanc. Soc. Phys. Hist. nat. 10, 94 (1975).

⁵ B. MUTSCHLECHNER, Travail de Diplôme, non publié (1975).

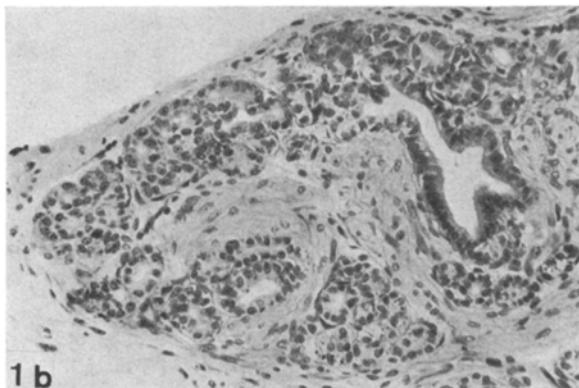
⁶ TH. FEYEL-CABANES, P. PENNEQUIN, E.-E. BEAULIEU et P. ROBEL, C. r. Acad. Sci., Paris D 278, 2181 (1974).



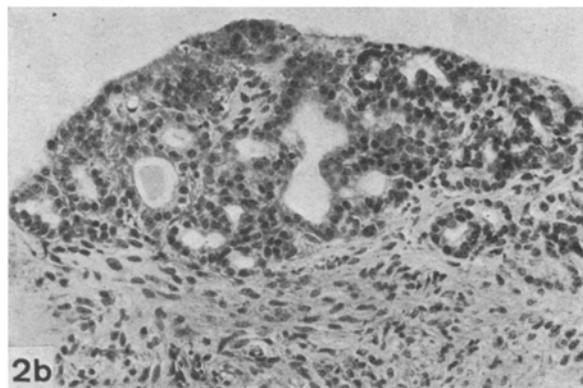
1a



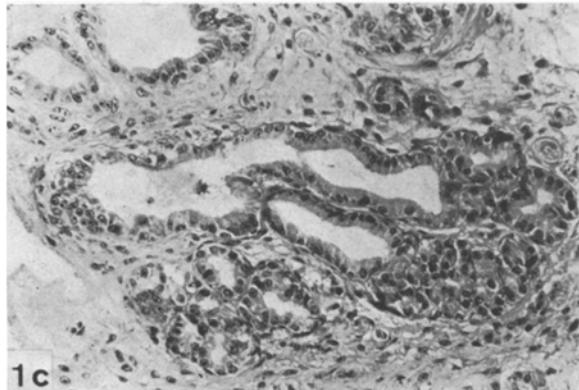
2a



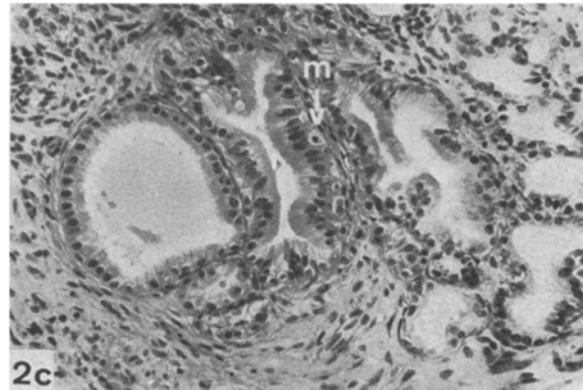
1b



2b



1c



2c

Fig. 1. Prostate d'un *Ellobius* adulte. $\times 180$. a) Fragment témoin hors culture; b) fragment témoin après 1 semaine de culture; c) fragment en culture pendant 1 semaine, traité pendant 6 jours par de la testostérone ($10^{-6} M$).

Fig. 2. Prostate d'un *Ellobius* impubère (âgé de 6 semaines). $\times 180$. a) Fragment témoin hors culture; b) fragment témoin après 1 semaine de culture; c) fragment en culture pendant 1 semaine, traité pendant 6 jours par de la testostérone ($10^{-6} M$). m, mitose.

fragments d'organe sont déposés sur du papier à lentille reposant sur des billes de verre disposées dans la cavité centrale où l'on introduit 1 ml de milieu. Les substances nutritives arrivent ainsi aux tissus par diffusion à travers le papier. Nous avons utilisé le milieu TC 199 de DIFCO additionné de 10% de sérum de cheval ou de veau. Ce milieu est partiellement renouvelé tous les 2 à 3 jours. Les cuves sont placées dans un incubateur maintenu à une température de 35°C.

Traitements hormonaux: pour les cultures de prostates adultes nous avons utilisé comparativement la testostérone, l'androstanolone (dihydrotestostérone) et le 5-androstan-3,17-diol à 3 concentrations différentes, soit $10^{-6} M$, $10^{-7} M$ ou $10^{-8} M$. Les cultures de prostates impubères ont uniquement été traitées par de la testostérone à 2 concentrations différentes, soit $10^{-6} M$ ou $10^{-7} M$; il en fut de même des prostates de rats castrés. Les hormones sont dissoutes dans du propylène-glycol et les dilutions faites dans le milieu de culture. Les hormones sont introduites dans le milieu de culture après 24 h d'incubation, les cultures étant maintenues en tout pendant une semaine. Le 7^e jour de culture les fragments prostatiques sont fixés au Bouin, inclus dans la paraffine, coupés en série à 4 µm et colorés à l'Hemalun-Eosine pour pouvoir être soumis à un examen histologique.

Résultats et discussion. 1. Cultures de prostates d'*Ellobius* en l'absence d'androgènes. D'une manière générale la structure des prostates formées d'amas d'acini entourant des canalicules excréteurs, est maintenue intégralement dans nos conditions de culture. Même en l'absence d'hormones les organocultures ne présentent aucun signe de nécrose avant le 7^e jour d'incubation à partir duquel commencent à apparaître quelques noyaux pyknotiques. Contrairement à ce qui a été observé chez le rat^{7,8}, où l'épithélium prostatique involue complètement au bout de 6 jours de culture en l'absence d'androgènes, l'addition de ces hormones n'est pas nécessaire au maintien des prostates d'*Ellobius* pendant la première semaine de culture. a) Les prostates des animaux adultes se développent mieux *in vitro* qu'*in vivo*: les cellules épithéliales constituant la paroi des acini et canalicules sont nettement plus hautes après 5 à 7 jours de culture que celles des prostates témoins hors culture (Figure 1a et b). b) Chez l'animal impubère la différence entre prostates en culture et hors culture paraît moins importante (Figure 2a et b). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'*in vivo* les prostates subissent une sorte de régression à partir de la puberté; en effet, rapportées au poids du corps les prostates sont plus volumineuses chez l'im-

pubère que chez l'adulte où elles sont identiques à celles des castrats⁵.

2. Action des androgènes sur les organocultures de prostates.

a) Prostatae d'*Ellobius* adulte: aucun des 3 androgènes utilisés n'a réussi à induire une stimulation significative des tissus prostatiques provenant d'animaux adultes. Après une semaine de culture la structure histologique des prostatae traitées est pratiquement identique à celle des prostatae témoins en culture (Figure 1b et c). b) Prostatae de rats castrés: pour vérifier si l'absence de réponse aux androgènes des cultures de prostatae d'*Ellobius* adulte n'était pas due à nos méthodes expérimentales nous avons mis en culture dans des conditions rigoureusement identiques des prostatae de rats castrés. Les mêmes androgènes, aux mêmes conditions que celles utilisées pour les prostatae d'*Ellobius*, ont restimulé l'épithélium prostatique des rats castrés. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par FEYEL-CABANES et al.⁶, dont nous avons reproduit l'expérience. c) Prostatae d'*Ellobius* impubère: ces prostatae réagissent à un traitement par la testostérone pendant 6 jours de culture par une hypertrophie et une hyperplasie des cellules constituant l'épithélium des canaux et acini. En comparaison avec les témoins en culture la hauteur de ces cellules a triplé, même quadruplé dans les plus fortes stimulations observées notamment chez les animaux âgés de 6 semaines (Figure 2b et c); ces cellules présentent toutes les caractéristiques d'une activité sécrétrice: noyau en position basale, pôle apical surmonté d'une vacuole de résorption. La plupart des canalicules des prostatae traitées contiennent de la sécrétion. On peut également observer des mitoses au niveau de l'épithélium stimulé (Figure 2c).

Conclusions. L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* est en accord avec ceux que nous avons enregistrés *in vivo*: dans les deux conditions aucun traitement aux androgènes n'a réussi à stimuler l'épithélium prostatique d'*Ellobius lutescens* adulte; *in vitro*, une réponse positive à la testostérone a pu être enregistrée au niveau des prostatae provenant d'animaux impubères, *in vivo* cette réponse n'est obtenue que chez les animaux castrés à l'état impubère. Ceci signifie donc que les prostatae d'*Ellobius lutescens* deviennent insensibles aux androgènes à partir de la puberté; un phénomène analogue a également été observé au niveau de l'épithélium séminal qui perd sa réactivité aux hormones à la même période⁴.

⁷ I. LASNITZKI, J. Endocr. 30, 225 (1964).

⁸ P. ROBEL, I. LASNITZKI, E.-E. BEAULIEU, Biochimie 53, 81 (1971).

Influence of Castration and Testosterone Replacement on Hypothalamic Tyrosine Hydroxylase Activity in the Rat

C. W. BEATTIE and MARGARET M. MARTIN

Endocrinology Section, Wyeth Laboratories, Research Division, Box 8299, Philadelphia (Pennsylvania 19101, USA), 2 February 1976.

Summary. Hypothalamic tyrosine hydroxylase (TH) activity of castrate rats is modulated by testosterone propionate (TP) *in vivo*. Kinetic studies revealed that both V_{max} and K_m were virtually unaltered for substrate tyrosine in the presence of an excess of DMPH₄ cofactor. TP replacement to castrate rats increased the K_m for added DMPH₄ cofactor, while V_{max} decreased. These results suggest that TP decreases TH activity of castrate rats by inhibiting the enzyme-reduced pteridine cofactor complex.

Progesterone significantly reduces hypothalamic tyrosine hydroxylase (TH) activity of ovariectomized rats *in vivo* and *in vitro*^{1,2} apparently by inhibiting the enzyme-reduced cofactor complex. Testosterone has been re-

ported to partially reverse the castration-induced increase in median eminence TH activity of male rats³. This study was initiated to determine if reduction of the castration-induced rise in hypothalamic TH activity by