

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-androstane-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 μ m 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 pycnotiques. 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) Prostates 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 prostates traitées est pratiquement identique à celle des prostates témoins en culture (Figure 1b et c). b) Prostates de rats castrés: pour vérifier si l'absence de réponse aux androgènes des cultures de prostates d'*Ellobius* adulte n'était pas due à nos méthodes expérimentales nous avons mis en culture dans des conditions rigoureusement identiques des prostates de rats castrés. Les mêmes androgènes, aux mêmes conditions que celles utilisées pour les prostates 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) Prostates d'*Ellobius* impubère: ces prostates 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 des⁴ prostates 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 prostates 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 prostates 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

testosterone was mediated through inhibition of the enzyme reduced cofactor complex, or a decrease in affinity for its substrate, tyrosine.

Materials and methods. The groups of adult (200–250 g) castrated, male Sprague Dawley rats (Charles River) received either daily 50 μ g s.c. injections of testosterone propionate (TP) in corn oil, or corn oil alone, for 7 days beginning on the day of castration. Sham-castrated controls received daily injections of corn oil. Rats were sacrificed on day 8 by decapitation and the brains were immediately removed and chilled in dry-ice-acetone. Hypothalamic fragments⁴ were homogenized in 0.4 ml of ice cold 0.25 M sucrose solution in a glass-teflon narrow clearance homogenizer. The method of MÜLLER et al.⁵ was used for assay of TH, but substituted whole homogenates for the 26,000 $\times$ g supernatant fluid. DMPH₄ (6, 7-dimethyl-5, 6, 7, 8-tetrahydropteridine HCl.5H₂O) was selected to fill the cofactor requirement as the K_m and relative activity of this artificial cofactor approach that of tetra-hydro-biopterin, the proposed natural cofactor⁶. Endogenous tyrosine was assayed by a modification of the method of WAALKES and UDENFRIEND⁷.

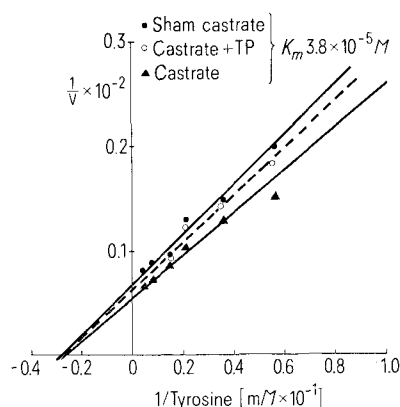


Fig. 1. Reciprocal plot of the effect of tyrosine concentration on the activity of hypothalamic tyrosine hydroxylase. Velocity is in nanomoles Dopa/g tissue/h. Tyrosine concentrations were varied from 1.8×10^{-4} M to 1.2×10^{-5} M. Each point represents the mean of 4 experiments.

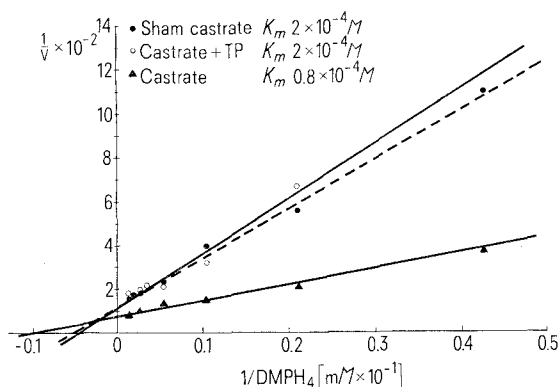


Fig. 2. Reciprocal plot of hypothalamic tyrosine hydroxylase activity with varying concentrations of added DMPH₄. Velocity is in nanomoles Dopa/g tissue/h. DMPH₄ concentrations were varied from 0.24 mM to 7.6 mM. Each point represents the mean of 4 experiments.

Results and discussion. As expected castration significantly reduced seminal vesicle and ventral prostate weights. Daily injection of 50 μ g TP increased seminal vesicle and ventral prostate weight to that of intact controls. Endogenous hypothalamic tyrosine levels were not altered in any treatment group. The Lineweaver-Burk plot illustrated in Figure 1 demonstrates the effect of increasing tyrosine concentrations on hypothalamic TH activity of control, castrate and castrate plus TP treated rats.

The K_m for the substrate (tyrosine) as well as the V_{max} remained virtually unaltered among the 3 groups when added DMPH was not limiting. Castration decreased the K_m for added DMPH₄ and increased V_{max} . TP replacement increased the K_m for added DMPH₄ and reduced V_{max} to approximately that of sham-castrated controls (Figure 2). Changes in velocity of hydroxylation V_{max} after castration and TP replacement to castrate rats are therefore apparently unrelated to affinity for substrate.

The data presented in this study confirm the increase in *in vivo* hypothalamic TH activity of castrate male rats over that of intact controls³. In addition, they suggest that the inhibition of TH activity observed after replacement to castrate male rats is not dependent on substrate concentration as K_m values for tyrosine were well within those previously reported for brain tissue^{8,9}. Rather, it would appear that TP modulates TH activity by interacting with the enzyme-cofactor complex through a mixed mechanism. These observations correlate well with the inhibition of hypothalamic TH activity observed following replacement of progesterone to ovariectomized female rats¹ or with hypothalamic fragments from ovariectomized rats incubated *in vitro*². Apparently TP, like progesterone, inhibits hypothalamic TH activity in a manner resembling that of norepinephrine and dopamine which are non-competitive with substrate, but competitive with the reduced pteridine cofactor, for the oxidized enzyme¹⁰. Whether the modulation of hypothalamic TH by TP *in vivo* resides solely on an interaction with the enzyme-substrate-cofactor complex or an alteration of catecholamine uptake and/or release remains to be determined.

¹ C. W. BEATTIE, C. H. RODGERS and L. F. SOYKA, *Endocrinology* 91, 276 (1972).

² C. W. BEATTIE and L. F. SOYKA, *Endocrinology* 93, 1453 (1973).

³ J. S. KIZER, M. PALKOVITS, J. ZIVIN, M. BROWNSTEIN, J. M. SAAVEDRA and I. J. KOPIN, *Endocrinology* 95, 799 (1974).

⁴ J. GLOWINSKI and L. L. IVERSON, *J. Neurochem.* 13, 655 (1966).

⁵ R. A. MÜLLER, H. THOENEN and J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Ther.* 169, 74 (1969).

⁶ T. NAGATSU, K. MIZUTANI, I. NAGATSU, S. MATSUURA and T. SUGIMOTO, *Biochem. Pharmac.* 21, 1945 (1972).

⁷ T. P. WAALKES and S. UDENFRIEND, *J. Lab. clin. Med.* 50, 733 (1972).

⁸ R. KUCZENSKI and L. L. IVERSON, *J. Neurochem.* 19, 131 (1972).

⁹ E. G. MCGEER, S. GIBSON, J. A. WADER and P. L. MCGEER, *Can. J. Biochem.* 45, 1942 (1967).

¹⁰ K. E. MOORE and J. A. DOMINIC, *Fedn. Proc.* 30, 859 (1971).