

with 0.25% trypsin in Puck's saline A¹⁰ for 30 min at 37°C in a gyratory water bath shaker.

In all cases, the cells were initially plated in a Dulbecco's MEM medium¹¹ containing 4500 mg glucose/l and supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and gentamycin (0.05 mg/ml, Shering) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂:95% air. After 3 days the amount of FBS was reduced to 5% and a day later the medium was changed to one containing 5% of the mammalian serum to be tested. The final cell density of each culture well at this point was 5.0–6.0 × 10⁴ cells/cm² of surface area as determined by standard hemocytometric methods. Sera selected for testing included the following: bovine (Grand Island, Santa Clara, Calif.), fetal bovine (Grand Island), horse (Grand Island), human (Microbiological Associates, Los Angeles, Calif.), lamb (Grand Island), porcine (Grand Island), and rabbit (Microbiological Associates).

Thymidine incorporation was measured as follows: After the cells had been exposed to the selected serum for 20 h, ³H-thymidine (45 Ci/mole, Research Products Corp., Elk Grove Village, Ill.) was added to the medium at a concentration of 1 µCi/ml media for the final 2 h of incubation. The cells were washed once in unlabeled media, twice with cold 5% trichloroacetic acid (TCA) and then placed at 4°C for the next 2 days with fresh TCA to remove any unincorporated ³H-thymidine. Cells were finally rinsed with distilled water and dissolved in 88% formic acid. An aliquot of this solution was assayed for radioactivity and the results were expressed as cpm incorporated into TCA-insoluble material over the 2-h labelling period.

Results and discussion. Normal MMEC responded markedly to selected sera by incorporating more ³H-thymidine

than serum-free controls. Rabbit serum was the most potent (3.5 times the control), followed by porcine (2.8 times), calf (2.7 times), and human sera (2.1 times) (figure). Preneoplastic cells, on the other hand, incorporated somewhat less ³H-thymidine in response to serum (only 2fold above serum-free controls in the presence of porcine serum) (figure). Regardless of the type of serum used, the HOG cultures always incorporated less ³H-thymidine than similarly supplemented normal cultures. A further observation is that both normal and preneoplastic cells respond almost identically in serum-free medium. Thus, it appears that cultures of preneoplastic cells, while displaying a decreased sensitivity to serum, retain as high a rate of incorporation in the absence of serum as do identically cultured normal cells.

Tumor cells incorporated ³H-thymidine at a rate markedly lower than cells from normal glands and hyperplastic outgrowths (figure). FBS yielded the maximum stimulus of 1.8fold above serum-free controls. However, unlike normal and preneoplastic cells, tumor cells exposed to serum-free medium incorporated comparatively low levels of ³H-thymidine. Thus, we may conclude that these cultured tumor cells have a decreased sensitivity to serum and possess a substantially reduced ability to incorporate thymidine in medium free of serum.

The significance of these data lies in the area of cellular recognition. Morphologically and biochemically, monolayer cultures of normal, preneoplastic and neoplastic MMEC often closely resemble one another. Thus, the differential responsiveness of normal and abnormal cells observed in these studies may prove important as an additional means of identifying these cells *in vitro*.

Les cellules mammatropes et somatotropes de l'antéhypophyse chez la souris C3H porteuse de tumeur mammaire spontanée. Etude quantitative au microscope électronique^{1,2}

Mammatropic and somatotropic pituitary cells in spontaneous mammary tumor bearing C3H female mice. A quantitative electron microscope study

K. H. Hollmann et J. M. Verley

Laboratoire de cytopathologie et de microscopie électronique, Hôpital Broussais, 96, rue Didot, F-75674 Paris Cédex 14 (France), 12 mai 1977

Summary. Pituitaries of mammary tumor-bearing mice (C3H) were examined by quantitative electron microscopy. The results indicate that considerable modifications occur in mammatropic and somatotropic cells. Both types show an increase of the surface of the endoplasmic reticulum and a decrease of the volume of secretory granules (in percent of cytoplasmic volume), suggesting a heightened secretory activity of these cells during mammary carcinogenesis.

Il existe de nombreux arguments en faveur du rôle de l'hypophyse dans la genèse et la croissance des tumeurs mammaires tant chez l'animal³⁻⁹ que chez l'homme¹⁰⁻¹³. Parmi les hormones hypophysaires, la prolactine a une action majeure et sa production semble augmentée au cours de la carcinogénèse mammaire. Ainsi la concentration en prolactine de l'hypophyse est plus élevée chez la chienne atteinte de cancer mammaire¹⁴ et chez la femme atteinte de cancer du sein à un stade avancé¹⁵⁻¹⁷ que chez les sujets témoins. De même la concentration dans l'hypophyse est généralement plus élevée chez la souris de souche à haute incidence cancéreuse¹⁸, et le taux plasmatique de prolactine semble augmenté chez les femmes à haut risque¹⁹.

A l'opposé les dérivés de l'ergot de seigle, qui inhibent la sécrétion de prolactine, réduisent l'incidence et la croissance des tumeurs mammaires chez le rat et chez

la souris²⁰. L'influence de l'hormone de croissance est moins bien précisée mais semble également importante: chez la souris hypophysectomisée, ovariectomisée et surrénalectomisée l'injection d'hormone de croissance est nécessaire à l'induction de lésions préneoplasiques et à leur transformation cancéreuse, au moins dans certaines souches^{4,5}.

L'objet de ce travail est d'étudier les modifications morphologiques des cellules mammatropes et somatotropes chez la souris porteuse de tumeur mammaire spontanée et d'apprécier le degré d'activité de ces 2 types cellulaires de façon aussi précise que possible par l'application de méthodes morphométriques au microscope électronique.

Matériel et méthodes. Le matériel provient de 8 souris C3H ♀ (MTV +) porteuses de tumeur mammaire spontanée et de 4 souris C3H ♀ (MTV +) témoins non

atteintes de tumeur mammaire. Les hypophyses, prélevées après décapitation, ont été fixées à l'acide osmique, préparées en vue de leur étude au microscope électronique, et analysées quantitativement selon une technique employée dans des travaux antérieurs et décrite en détail ailleurs^{21, 22}.

Résultats et discussion. Les résultats obtenus sont indiqués dans les tableaux 1 et 2. Ils montrent l'existence de modifications importantes dans les hypophyses de souris porteuses de tumeur mammaire par rapport aux souris témoins normales. Ces modifications intéressent aussi bien les cellules à prolactine que les cellules somatotropes, et sont parallèles entre elles.

1. Dans les cellules à prolactine: a) La surface ergastoplasmique (exprimée en μm^2 par μm^3 de cytoplasme) est plus élevée chez les animaux porteurs de tumeur mammaire ($3,0 \pm 0,1$) que chez les animaux témoins ($2,0 \pm 0,2$). Cette augmentation est hautement significative ($p < 0,0001$). b) Le volume des grains de sécrétion, exprimé en % de volume cytoplasmique, est plus faible ($6,2 \pm 0,3$) chez les animaux porteurs de tumeur que chez les animaux témoins ($8,1 \pm 0,5$). Cette différence est là encore statistiquement significative ($0,01 > p > 0,001$). c) Le volume mitochondrial, également exprimé en % de volume cytoplasmique, n'indique aucune différence significative ($p > 0,1$) chez les animaux cancéreux ($7,4 \pm 0,3$) par rapport aux animaux témoins ($7,6 \pm 0,6$).

2. Dans les cellules somatotropes: a) La surface ergastoplasmique est augmentée de façon significative ($p < 0,001$) chez les souris porteuses de tumeur mammaire spontanée ($2,5 \pm 0,1$) par rapport aux souris témoins ($1,3 \pm 0,1$). b) Le volume des grains sécrétoires est réduit chez les souris cancéreuses ($20,7 \pm 0,9$) par rapport aux souris témoins ($25,0 \pm 1,7$). Cette réduction est statistiquement significative ($0,05 > p > 0,01$). c) Le volume mito-

chondrial est réduit de façon non significative ($0,1 > p > 0,05$) chez les souris porteuses de tumeur mammaire ($5,9 \pm 0,3$) par rapport aux témoins ($6,9 \pm 0,5$).

Les modifications essentielles observées dans l'hypophyse de souris porteuses de tumeur mammaire par rapport aux souris témoins sont donc l'augmentation de la surface ergastoplasmique et la réduction du volume des grains sécrétoires dans les cellules mammatropes et dans les cellules somatotropes antéhypophysaires. Ces modifications sont celles que l'on observe en phase de pleine activité sécrétoire, au cours de la grossesse et de la lactation²³. L'augmentation de la surface ergastoplasmique, c'est-à-dire de l'appareil de synthèse de la cellule, traduit l'augmentation de la capacité sécrétoire²⁴. La réduction du volume des grains sécrétoires semble témoigner de l'extrusion du produit sécrétoire au fur et à mesure de son élaboration et s'oppose aux images de stockage observées après inhibition de la sécrétion prolactinique^{25, 26}. L'ensemble de ces résultats doit être interprété comme la traduction morphologique de l'augmentation de l'activité sécrétoire des cellules mammatropes et somatotropes chez les animaux porteurs de tumeur mammaire.

Tableau 1. Cellules mammatropes*

	Mitochondries		Ergastoplasme		Grains sécrétoires	
	Tem	Ca	Tem	Ca	Tem	Ca
n	36	158	36	158	36	158
Moyenne	7,6	7,4	2,0	3,0	8,1	6,2
SE	0,6	0,3	0,2	0,1	0,5	0,3
t-test	0,37		5,8		3,3	
p	$p > 0,10$		$p < 0,0001$		$0,01 > p > 0,001$	

* Surface cytoplasmique analysée: Tem, 2277 μm^2 ; Ca, 7841 μm^2 . n, Nombre de photos analysées; Tem, souris témoins; Ca, souris porteuses de tumeur mammaire spontanée; SE, erreur standard.

Tableau 2. Cellules somatotropes*

	Mitochondries		Ergastoplasme		Grains sécrétoires	
	Tem	Ca	Tem	Ca	Tem	Ca
n	40	206	40	206	40	206
Moyenne	6,9	5,9	1,3	2,5	25,0	20,7
SE	0,5	0,3	0,1	0,1	1,7	0,9
t-test	1,8		11,9		2,3	
p	$0,1 > p > 0,05$		$p < 0,001$		$0,05 > p > 0,01$	

* Surface cytoplasmique analysée: Tem, 2940 μm^2 ; Ca, 18 216 μm^2 . n, Nombre de photos analysées; Tem, souris témoins; Ca, souris porteuses de tumeur mammaire spontanée; SE, erreur standard.

- 1 Une partie de ce travail a fait l'objet du mémoire pour le titre d'Assistant étranger de Mlle G. G. Sotiropoulou.
- 2 Avec la collaboration technique dévouée de Mme J. Garaudel et l'aide de l'I.N.S.E.R.M., du C.N.R.S. et de la Ligue Nationale Française contre le Cancer.
- 3 O. Mühlbock, Adv. Cancer Res. 4, 371 (1956).
- 4 S. Nandi, H. A. Bern et K. B. DeOme, J. nat. Cancer Inst. 24, 883 (1960a).
- 5 S. Nandi, H. A. Bern et K. B. DeOme, Acta Unio int. contra Cancr. 16, 211 (1960b).
- 6 C. W. Welsch, T. W. Jenkins et J. Meites, Cancer Res. 30, 1024 (1970).
- 7 J. Furth, dans: Prolactin and carcinogenesis, p. 137. Ed. A. R. Boynes et K. Griffiths. Cardiff 1972.
- 8 J. Meites, J. nat. Cancer Inst. 48, 1217 (1972).
- 9 D. Medina, J. nat. Cancer Inst. 53, 223 (1974).
- 10 L. M. Boot, Int. J. Cancer 5, 167 (1970).
- 11 O. Mühlbock, J. nat. Cancer Inst. 48, 1213 (1972).
- 12 H. Salih, H. Flax, W. Brander et J. R. Hobbs, Lancet 2, 1103 (1972).
- 13 H. Friesin et P. Hwang, A. Rev. Med. 24, 251 (1973).
- 14 P. G. Saluja, J. M. Hamilton, M. Gronow et W. Misdorp, Eur. J. Cancer 10, 63 (1974).
- 15 R. M. L. Murray, G. Mozaffarian et O. H. Pearson, dans: Prolactin and carcinogenesis, p. 158. Ed. A. R. Boynes et K. Griffiths. Cardiff 1972.
- 16 I. Mittra, J. L. Hayward et A. S. Mc Neilly, Lancet 1, 889 (1974).
- 17 W. C. Hymer, J. Snyder, W. Wilfinger, R. Bergland, B. Fischer et O. Pearson, J. nat. Cancer Inst. 57, 995 (1976).
- 18 Y. N. Sinha, C. B. Salocks, W. P. Vanderlaan, Endocrinology 97, 1112 (1975).
- 19 H. G. Kwa, M. De Lang-Bakker, E. Engelsman et F. J. Cleton, Lancet 1, 433 (1974).
- 20 H. G. Floss, J. M. Cassady et J. E. Robbers, J. pharm. Sci. 62, 699 (1973).
- 21 K. H. Hollmann, Z. Zellforsch. 87, 266 (1968).
- 22 K. H. Hollmann, dans: Lactogenesis, p. 27. Ed. M. Reynolds et S. J. Folley. University of Pennsylvania Press, Philadelphia 1969.
- 23 J. M. Verley et K. H. Hollmann, dans: Lactation, p. 89. Ed. I. R. Falconer, Butterworth, London 1971.
- 24 J. L. Pasteels, dans: Cytologie de l'adénohypophyse, p. 137. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique Paris 1963.
- 25 J. L. Pasteels, A. Danguy, M. Frerotte et F. Ectors, Annls. Endocr. 32, 188 (1971).
- 26 A. Danguy et J. L. Pasteels, dans: La Bromocriptine, p. 9. Ed. Sandoz, Paris 1976.

En ce qui concerne les cellules mammothropes les résultats de notre étude concordent donc avec les études biochimiques effectuées chez l'animal et chez l'homme, qui indiquent que dans plusieurs espèces existent une augmentation de la sécrétion de prolactine chez les sujets porteurs de cancer mammaire.

Le rôle de cette perturbation et le mécanisme de contrôle de la sécrétion de la prolactine sont encore mal connus. Mais des arguments parlent en faveur d'une altération primaire de la fonction thyroïdienne qui serait abaissée. La baisse du taux des hormones thyroïdiennes, d'une part sensibiliserait les cellules mammaires à l'égard de la prolactine, et d'autre part entraînerait une hyper-

production de TRH qui agit aussi comme «releasing factor» de la prolactine. C'est ce mécanisme d'hypo-sécrétion de thyroxine-hypersecrétion de prolactine qui serait responsable du développement de dysplasies puis de néoplasies des tissus mammaires¹⁶.

L'étude morphométrique au microscope électronique effectuée ici confirme l'existence d'une hyperactivité des cellules à prolactine chez la souris C3H (MTV +) porteuse de tumeur mammaire. Mais elle souligne aussi l'importance des cellules somatotropes qui témoignent d'une hyperactivité fonctionnelle parallèle à celle des cellules mammothropes. La signification et le rôle de ces perturbations méritent d'être précisés.

Synaptic vesicles and other organelles of human mossy fibre endings.

A morphometric study¹

M. M. Paula-Barbosa, M. A. Sobrinho-Simões and C. Cruz

Anatomical Institute, Laboratory of Pathology and Department of Neurology, Medical School, University of Oporto, Oporto (Portugal), 13 May 1977

Summary. The mossy fibre ending organelles of 6 men were studied, using morphometric methods. The numerical densities of agranular, coated and dense core vesicles, as well as the number of agranular vesicles per μm^2 of the synaptic surface and per synapse were calculated.

Recently, Dyson and Jones² have pointed out that, apart from the variations that can be found in the synaptic contacts of under-nourished rats³, there are significant differences in the synaptic vesicular population of these animals. However, the absence of an accurate determination of correcting factors for form and size distribution of synaptic contacts⁴, which are needed for the calculation of their numerical densities⁵, has not allowed us to establish a numerical relationship between synaptic vesicles and synapses. Since the accurate determination of such factors appears to be even more difficult in man than in experimental conditions, it seems advisable, in quantitative studies concerning human terminals, to use a procedure that can avoid such difficulty. We have studied human mossy fibre endings with a morphometric method⁶ that allows their quantitative ultrastructural characterization without having to take into consideration the factors cited above.

Material and methods. Observations were made on the granular layer of the cerebellar cortex of 6 men (males of 9, 15, 33, 34, 39 and 41 years old). Tissue fragments of the posterior lobe of the cerebellar hemispheres of 5 men were obtained during surgery for removal of acoustic neu-

romas of the cerebello-pontine angle. In the 6th man, tissue fragments were removed from the pyramid of the cerebellar vermis during brain surgery for removal of a medulloblastoma of the 4 ventricle. The ethical principles of the Helsinki Declaration of 1964, concerning human experimentation, were followed. In all cases, blocks were fixed according to the Kanaseki and Kadota⁷ method; details of the procedure were described in a previous study⁸.

- 1 This work was granted by INIC: Centro de Morfologia Experimental (MbP1) e Centro de Anatomia Patológica e Oncologia (MbP3).
- 2 S. E. Dyson and D. G. Jones, *Brain Res.* 114, 365 (1976).
- 3 P. Gambetti, L. Autilio-Gambetti, N. Rizzuto, B. Shaffer and L. Pfaff, *Expl. Neurol.* 43, 464 (1974).
- 4 G. Vrensen and D. DeGroot, *Brain Res.* 58, 25 (1973).
- 5 T. M. Mayhew, *J. Microsc.* 96, 37 (1972).
- 6 E. R. Weibel, in: *Principles and Techniques of Electron Microscopy*, p. 239. Ed. M. A. Hayat. Van Nostrand Reinhold Company, New York 1973.
- 7 T. Kanaseki and K. Kadota, *J. Cell Biol.* 42, 202 (1969).
- 8 M. Paula-Barbosa and E. G. Gray, cited by E. R. Weibel, *J. Neurocytol.* 3, 471 (1974).

Summary of the ultrastructural morphometric study of mossy fibre ending organelles in 6 men

	Observation No.	Agranular vesicles N_V (No./ μm^3)	Coated vesicles N_V (No./ μm^3)	Dense core vesicles N_V (No./ μm^3)	Mitochondria V_V ($\mu\text{m}^3/100 \mu\text{m}^3$)	Multivesicular bodies V_V ($\mu\text{m}^3/100 \mu\text{m}^3$)	Smooth endoplasmic reticulum S_V ($\mu\text{m}^2/100 \mu\text{m}^3$)
Man	I	840 $\pm$ 80*	12.4 $\pm$ 2.1*	1.85 $\pm$ 0.39*	22.0 $\pm$ 2.4*	0.22 $\pm$ 0.08*	47.5 $\pm$ 5.4*
	II	1015 $\pm$ 45	11.9 $\pm$ 2.0	0.95 $\pm$ 0.42	17.4 $\pm$ 0.8	0.15 $\pm$ 0.08	37.7 $\pm$ 2.9
	III	854 $\pm$ 27	10.9 $\pm$ 1.6	2.58 $\pm$ 0.52	20.9 $\pm$ 1.0	0.20 $\pm$ 0.07	40.3 $\pm$ 3.0
	IV	973 $\pm$ 32	9.4 $\pm$ 2.1	1.50 $\pm$ 0.31	19.9 $\pm$ 1.4	0.10 $\pm$ 0.05	39.6 $\pm$ 6.3
	V	850 $\pm$ 74	10.4 $\pm$ 0.9	2.33 $\pm$ 0.51	18.2 $\pm$ 1.8	0.36 $\pm$ 0.16	39.2 $\pm$ 3.2
	VI	954 $\pm$ 100	9.0 $\pm$ 1.2	0.96 $\pm$ 0.40	21.8 $\pm$ 2.0	0.10 $\pm$ 0.05	57.3 $\pm$ 8.2
	Interindividual mean $\pm$ SE	914 $\pm$ 31	10.7 $\pm$ 0.5	1.70 $\pm$ 0.28	20.0 $\pm$ 0.8	0.19 $\pm$ 0.04	43.6 $\pm$ 3.1

* Mean and SE of the mean of 5 blocks (10 micrographs from each block).