

3. Alkaline phosphatase activity was evaluated by a biochemical assay with sodium p-nitrophenol as substrate. The assay is described in detail elsewhere¹. Cytocentrifuge slides for morphological examination were prepared from each fraction.

Results. The polymorphonuclear contamination in all the BSA fractions was always less than 4% and the proportion of monocytes ranged between 1% and 20%. As the cell recovery in fractions 1 and 2 was always very low, between 0.4% and 1% of the initial number of cells, the cells recovered from these 2 fractions were pooled.

Figure 1 shows the percent of E-rosettes in the mononuclear cell population of each fraction. In the lower density fractions (1-3) the proportion of T-cells was always low; in 2 of the 4 samples it was < 5%, in 1 sample < 10% and in the last one 23.5%. The peak of T-cells was observed in fraction 4; the values decreased in fractions 5 and 6, but were still higher than in fractions 1-3. The results from fractions 3, 4, 5 and 6 were similar in the samples from the 4 subjects tested. The percent of B-lymphocytes appeared to be uniformly distributed throughout the different fractions (ranging between 9% and 20%).

Figure 2 shows the alkaline phosphatase activity in each cell fraction. In all the experiments the highest activity (mean 10.1 ± 1.6 SEM) was observed in the pooled samples from fractions 1 and 2 where the values were twice those observed in normal unseparated lymphocytes (broken line in figure 2). The lowest enzyme values (mean 2.4 ± 1.4 SEM) were found in fraction 4. The levels of activity increased slightly in the higher density fractions.

Discussion. The observation³ that high alkaline phosphatase values are found in the mononuclear cells of human cord blood, which contains few T-lymphocytes compared with adult blood and many non-T-, non-B-cells, suggested that the enzyme activity might be associated with the latter cells. The high values in 'common', non-B-, non-T- acute lymphoblastic leukaemia³ may support this view. The findings by Ruuskanen et al.¹ also suggested that alkaline phosphatase activity may be a feature of immature T-cells and that maturation may be associated with a loss in the enzyme content. The present studies demonstrate that the peak of alkaline phosphatase activity, well above values for unseparated lymphocytes, was observed in fractions 1-2 where the proportion of T-lymphocytes was lowest and the proportion of non-T-, non-B-cells highest. Others have

shown that null-cells with a high rate of spontaneous DNA synthesis are found in the low density fractions⁸.

The possibility that the high enzyme levels in fractions 1-2 may be related to the residual subpopulation of T-cells is unlikely because their percentage was always very low in these fractions. The lack of a relationship between T-lymphocytes and alkaline phosphatase activity is further shown by the low values observed in fraction 4, where the highest proportion of T-cells was found.

The uniformly low proportion of polymorphonuclear cells throughout all fractions rules out the possibility that neutrophil alkaline phosphatase contributed to the observed values. In experiments with cord blood removal of most of the monocytes and neutrophils from the mononuclear cell layer and incubation with the detergent Triton X-100 did not result in significant changes in alkaline phosphatase activity³.

The recent suggestion² that alkaline phosphatase may be associated with a subtype of B-cell lymphocyte cannot be completely excluded from this study because the only B-cell marker performed was SmIg with a polyvalent reagent, which does not enable to distinguish between various B-cell populations. However, it seems unlikely that B-cells can be responsible for the enzyme activity because they were distributed in low proportion (< 20%) throughout all fractions.

Our results indicate that high surface-membrane alkaline phosphatase activity is associated with non-T-, non-B-cells, but these experiments do not permit further characterization.

- 1 O.J. Ruuskanen, L.J. Pelliniemi and K.E. Kouvalainen, J. Immun. 114, 1611 (1975).
- 2 K. Nanba, E.S. Jaffe, R.C. Braylan, E.J. Soban and C.W. Berard, Am. J. clin. Path. 68, 535 (1977).
- 3 M.T.C. Kramers, D. Catovsky and R. Foa, Br. J. Haemat. 40, 111 (1978).
- 4 A.C. Campbell, C. Waller, J. Wood, A. Aynsley-Green and V. Yu, Clin. exp. Immun. 18, 469 (1974).
- 5 A. Hamburg, R.K. Brynes, C. Reese and H.M. Golomb, Lab. Invest. 34, 207 (1976).
- 6 K.A. Dicke, G. Tridante and D.W. van Bekkum, Transplantation 8, 422 (1969).
- 7 A.B. Wilson, D.G. Haegert and R.R.A. Coombs, Clin. exp. Immun. 22, 177 (1975).
- 8 R.S. Geha, F.S. Rosen and E. Merler, J. clin. Invest. 52, 1726 (1973).

Mise en évidence de l'induction de la coagulation plasmatique par les hémocytes chez *Locusta migratoria*

Role of hemocytes in hemolymph coagulation in *Locusta migratoria*

M. Brehélin

E.R.A. 118, Laboratoire de Biologie Générale, 12, rue de l'Université, F-67000 Strasbourg (France), 2 juin 1978

Summary. When performed at low temperature (4 °C), centrifugation of hemolymph from *Locusta migratoria* separates a plasma which does not exhibit any coagulation when it is preserved from the hemocyte pellet. Blood cells added to plasma, induce a rapid and normal coagulation (precipitation of coagulogen).

La majorité des hématologistes d'insectes admettent que la coagulation plasmatique est induite par les hémocytes. Cette conclusion repose uniquement sur l'observation des transformations de certains hémocytes au moment de la coagulation de l'hémolymph (travaux de microscopie optique^{1,2} et de microscopie électronique^{3,5}). C'est pourquoi Gupta et Sutherland⁶ ont pu émettre l'hypothèse que ces transformations des hémocytes pouvaient être l'effet et non

pas la cause de la coagulation, hypothèse reprise par Crossley⁷.

L'objet du présent travail est d'apporter une preuve expérimentale formelle du rôle des hémocytes dans l'induction de la coagulation plasmatique chez l'orthoptère *Locusta migratoria*.

Chez cet insecte, nous avons montré que la coagulation de l'hémolymph se traduit par la précipitation d'un complexe

lipo-glycoprotéique, le coagulogène^{8,9}; pour un même volume de plasma, à concentration de coagulogène égale, la coagulation est d'autant plus rapide que le nombre d'hémocytes est plus élevé¹⁰⁻¹². La suite de notre démonstration consiste à obtenir un plasma (liquide dans lequel baignent les hémocytes avant la coagulation) qui reste stable, puis à faire précipiter le coagulogène de ce plasma.

Préparation du plasma. Des larves de dernier stade, sont placées pendant 5 min dans une enceinte à -18°C . Toutes les opérations de prélèvement sont ensuite effectuées à une température de 4°C . Après avoir sectionné une patte métathoracique, nous recueillons l'hémolymphe dans un tube à hémolyse; une centrifugation légère ($900\times\text{g}$ pendant 20 sec) sépare un surnageant jaune, limpide, le plasma, et un culot blanc hémocytaire. Le plasma est immédiatement prélevé par pipetage; isolé des hémocytes, il peut être conservé plusieurs jours sans présenter de coagulation, même à une température de 25°C . La nécessité de manipuler rapidement ne permet pas de prélever à la fois l'hémolymphe de plus de 2 animaux. Comme nous l'exposons par ailleurs^{8,9}, la composition de l'hémolymphe n'est pas affectée par la réfrigération des larves. Cette méthode de prélèvement permet d'obtenir un plasma non-dilué et ne contenant aucune substance étrangère à l'hémolymphe, ce qui facilite les analyses qualitatives et quantitatives. De plus des contrôles effectués en microscopie électronique, ont montré que les hémocytes fixés immédiatement après le prélèvement du plasma ne présentent pas encore les transformations concomitantes de la coagulation de l'hémolymphe.

Induction de la coagulation plasmatique par les hémocytes. Du plasma ainsi préparé est divisé en aliquots de $200\text{ }\mu\text{l}$. Dans certains de ces aliquots on remet en suspension des hémocytes fraîchement obtenus par centrifugation (entre 7×10^5 et $1,2\times 10^6$ hémocytes par aliquot). Le plasma présente une précipitation, entre 2 et 5 min après la mise en suspension des hémocytes. Des analyses effectuées en électrophorèse et en immunoelectrophorèse montrent que le coagulogène n'est plus présent en solution dans ce plasma;

cette précipitation correspond donc bien à une coagulation plasmatique normale. Le plasma des aliquots n'ayant pas reçu d'hémocytes ne présente évidemment aucune coagulation. La coagulation de l'hémolymphe peut donc bien être induite par les hémocytes.

Nous avons essayé d'extraire des hémocytes le (ou les) facteurs capables d'induire la coagulation plasmatique. Pour cela, des broyats d'hémocytes ont été préparés dans des tampons tris-glycine ou véronal à pH 7,2 (entre $1,5\times 10^6$ et 3×10^6 hémocytes pour $100\text{ }\mu\text{l}$ de tampon). Des volumes de 20 à $100\text{ }\mu\text{l}$ de ces broyats ont été rajoutés à des aliquots de $200\text{ }\mu\text{l}$ de plasma; nous avons dans tous les cas obtenu une coagulation plasmatique; les mêmes volumes de tampon seul restent sans effet sur le plasma. Si l'on effectue une centrifugation de ces extraits (2 min à $2000\times\text{g}$), aucune activité ne peut être mise en évidence dans les surnageants alors que les culots ont permis d'induire la coagulation plasmatique dans la majorité des cas. Il ne nous a donc pas été possible, dans ces conditions, d'extraire des hémocytes le (ou les) facteur(s) induisant la coagulation de l'hémolymphe. Cette coagulation n'a pu être obtenue avec aucun autre tissu de l'insecte (tissu adipeux, hypoderme, chaîne nerveuse, mésentéron), ajoutés intacts ou broyés, au plasma.

- 1 C. Grégoire depuis 1950, repris dans C. Grégoire, *Physiol. Insecta* 5, 309 (1974).
- 2 D.A. Belden et R.A. Cowden, *Experientia* 27, 448 (1971).
- 3 J.A. Hoffmann et M.E. Stoeckel, *C.r. Soc. Biol.* 162, 2257 (1968).
- 4 G. Goffinet et C. Grégoire, *Arch. int. Physiol. Biochem.* 83, 707 (1975).
- 5 A.F. Rowley, *Cell Tissue Res.* 182, 513 (1977).
- 6 A.P. Gupta et D.J. Sutherland, *J. Insect Physiol.* 12, 1369 (1966).
- 7 A.C. Crossley, *Adv. Insect Physiol.* 11, 117 (1975).
- 8 M. Brehélin, Thèse d'Etat, no 1065, Strasbourg 1977.
- 9 M. Brehélin, *Comp. Biochem. Physiol.*, sous presse (1978).
- 10 M. Brehélin et J.A. Hoffmann, *C.r. hebdomadaire Séanc. Acad. Sci., Paris* 272, 1409 (1971).
- 11 M. Brehélin, *Acrida* 1, 167 (1972).
- 12 M. Brehélin et J.A. Hoffmann, *Acrida* 1, 197 (1972).

Reappearance of HCG-receptors in immature rat ovary after HCG-treatment is not due to receptor synthesis¹

J.W. Siebers², Th. Bauknecht, U. Müller and W. Engel

Universitäts-Frauenklinik, Hugstetterstrasse 55, D-7800 Freiburg, Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität, Albertstrasse 11, D-7800 Freiburg (Federal Republic of Germany), and Institut für Humangenetik, Nikolausberger Weg 5a, D-3400 Göttingen (Federal Republic of Germany), 19 April 1978

Summary. In 24-day-old rats the reappearance of ovarian HCG-receptors after the injection of 200 IU HCG is independent of protein synthesis. The reutilization of occupied receptors in immature female rats is due to dissociation of the receptor-hormone complex.

Evidence is accumulating that chronic exposure of target cells to high levels of hormone results in a decrease in sensitivity of the target cells to the hormone. Desensitization of target cells has been demonstrated for insulin^{3,4}, growth hormone⁵, thyrotropin releasing hormone⁶, catecholamine^{7,8} and human chorionic gonadotropin (HCG)⁹⁻¹². The effect of the hormones is mediated at the level of the target cell receptors resulting in a decrease in the number of free hormone receptors. This decrease could be due to an occupation of the binding sites by the hormone and/or to an actual loss of the surface receptors. We here report that in the immature rat ovary desensitization after high doses of HCG is caused by hormone occupancy of the receptors and not by their loss. Further-

more, the restoration of hormone binding starting at the 2nd day after the HCG-injection was found to be due to increasing numbers of dissociated hormone-receptor complexes and does not seem to depend upon receptor synthesis.

Material and methods. 24-day-old female rats of the strain SIV-50 were injected i.p. with 200 IU of HCG (Primogonyl, Schering AG, Berlin West) and the HCG-binding capacity of the ovaries was determined 0.5, 1, 2, 24 h and daily up to 7 days after the injection; 24- to 30-day-old untreated rats served as controls. In a 2nd experiment HCG-treated rats were injected i.p. with 3 doses of actinomycin D (1.5, 1, 1 $\mu\text{g/g}$ b.wt) or cycloheximide (2 $\mu\text{g/g}$ b.wt per injection). Since the toxicity of these substances does not allow a