

cells following sexual maturation. This finding is in positive correlation with the previous observations of Dey et al.⁵, that increased LAP activity is associated with HCG treatment and a fall of LAP activity following estrogen induced inhibition of gonadotropic hormones. Further it is now well known that the Leydig cells are stimulated during sexual maturation⁷⁻⁹ due to increased secretion of gonadotropins¹⁰.

Hence the present finding may further support the positive relationship between LAP activity and gonadotropin-regulated Leydig cell function in guinea-pigs. Therefore, on the basis of previous⁵ and the present experiments, the histochemical demonstration of LAP activity in the testis can be considered as a valuable parameter for evaluating the functional status of the Leydig cells in the guinea-pig.

* Reprint requests to be addressed to S. Chanda, 224, A.P.C. Road, Calcutta-4, India.

1 A.G.E. Pearse and G. Tremblay, *Nature*, Lond. **181**, 1532 (1958).

2 V.K. Hopsu and S. Talanti, *Annals Med. exp. Biol. Fenn.* **38**, 427 (1960).

3 S. Talanti and V.K. Hopsu, *Acta endocr.* **35**, 481 (1960).

4 S.K. Dey and C. Deb, *Acta histochem.* **45**, 71 (1973).

5 S.K. Dey, J. Sengupta and C. Deb, *J. Reprod. Fert.* **34**, 475 (1973).

6 M.M. Nachlas, B. Monis, D. Rosenblatt and A.M. Seligman, *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 261 (1960).

7 C.W. Hooker, in: *The Testis*, vol. 1, p. 489. Ed. A.D. Johnson, W.R. Gomes and N.L. Vandemark. Academic Press, New York 1970.

8 C.W. Hooker, in: *The Testis*, vol. 1, p. 513. Ed. A.D. Johnson, W.R. Gomes and N.L. Vandemark. Academic Press, New York 1970.

9 A. Albert, in: *Sex and Internal Secretions*, vol. 1, 3rd edn, p. 332. Ed. William C. Young. The Williams & Wilkins Co., Baltimore 1961.

10 A. Albert, in: *Sex and Internal Secretions*, vol. 1, 3rd edn, p. 351. Ed. William C. Young. The Williams & Wilkins Co., Baltimore 1961.

Effets de l'intoxication par le lindane sur les corpora allata de *Locusta migratoria* (Orthoptère)

Effects of intoxication by lindane on the corpora allata of *Locusta migratoria* (Orthoptera)

Brigitte Moreteau et F. Ramade

Laboratoire de Zoologie, Université de Paris-Sud, Equipe de Recherche Associée au CNRS, n° 227, F-91405 Orsay Cedex (France), 17 décembre 1979

Summary. The corpora allata of adult and 5th instar nymphs of the migratory locust exhibit several ultrastructural alterations after lindane intoxication. The type of cell degeneration observed here is very similar to ultrastructural changes obtained after the administration of precocene.

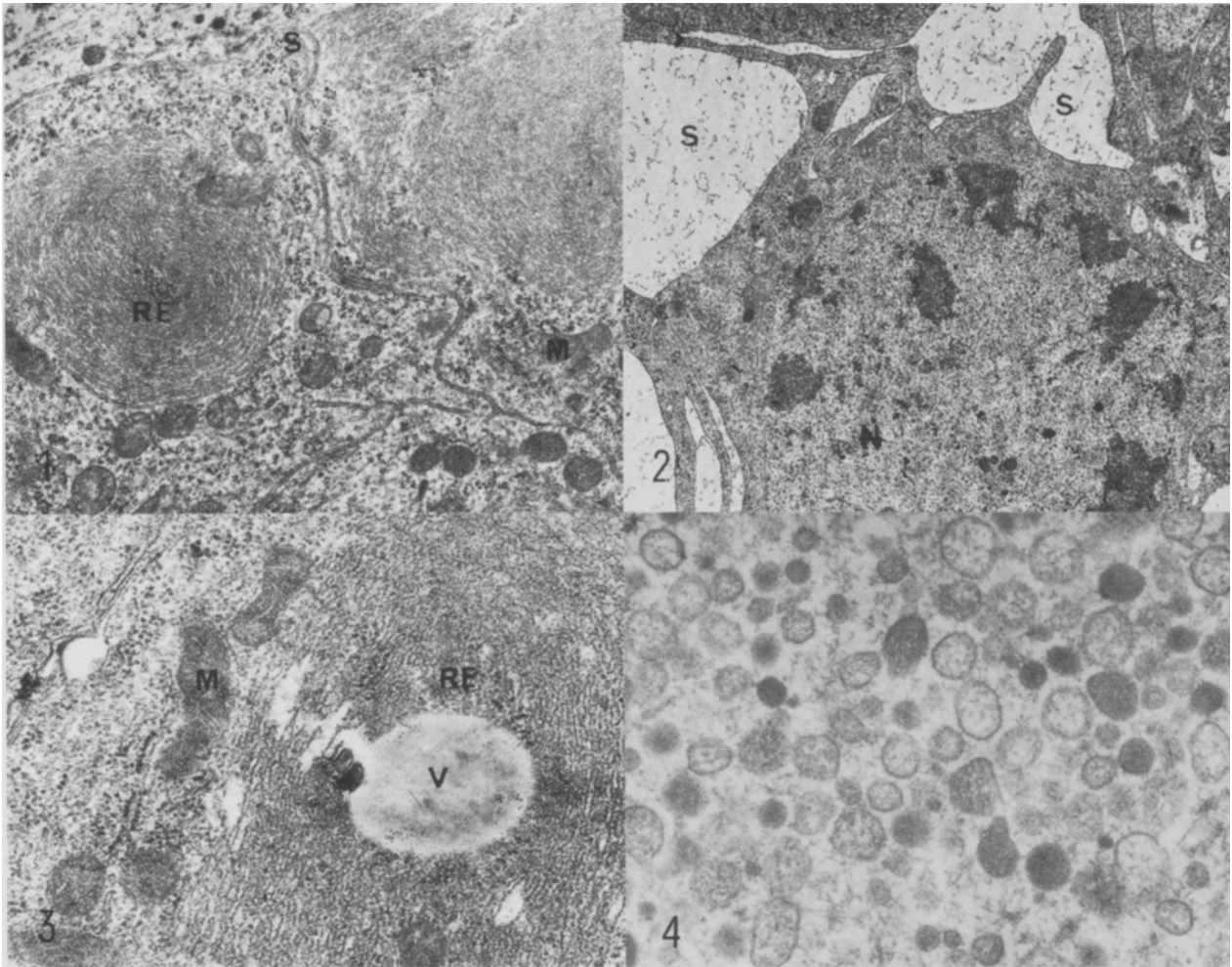
Dans nos travaux antérieurs¹, nous avons pu mettre en évidence diverses modifications ultrastructurales dans les cellules neurosécrétrices protocérébrales de mouches domestiques intoxiquées par le lindane. Nous avons montré, en outre, que l'intoxication par cet insecticide provoque des perturbations du développement ovarien avec stérilisation partielle ou totale selon le degré d'empoisonnement des femelles exposées à des doses subléthales. Récemment², nous avons examiné les effets cytopathologiques du lindane sur les corpora cardiaca du criquet migrateur, *Locusta migratoria* et décrit diverses lésions tant dans la partie nerveuse que dans la partie glandulaire de ces glandes. Nous complétons ces investigations par l'étude des effets de l'intoxication par le lindane sur les corpora allata. Les altérations ultrastructurales décrites dans la présente note suggèrent que le lindane, lors d'une intoxication aiguë, provoquerait une inhibition de l'activité glandulaire.

Matériel et méthodes. Des criques (*Locusta migratoria cinerascens*) de sexe femelle, au dernier stade larvaire (5e) et au début de la vie imaginaire, ont été intoxiqués par application topique d'une microgoutte d'une solution acétonique de lindane, déposée au niveau de la région collaire. Une dose subléthale provoquant environ 90% de knock-down en 24 h a été appliquée soit 6 µg par individu pour les larves du dernier stade et 8 µg par individu pour les imagos. L'action du lindane provoque des troubles neuromusculaires caractérisés par une série de symptômes cliniques se succédant de façon systématique et décrits chez *Schistocerca*³. On observe une phase prodromique typique, choreoataxique, clonique et psérique (ou paralytique). Les insectes étudiés ont atteint la phase paralytique. Les corpora allata ont été disséqués in situ après ouverture de la région

occipitale de la capsule céphalique et application d'une goutte de fixateur. Ce dernier est constitué par une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4) additionné de saccharose 0,15 M. Après rinçage, on réalise une postfixation dans du tétroxyde d'osmium à 1%. Les organes sont ensuite inclus dans l'épon 812. Les coupes ultrafines sont contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

Résultats. Les corpora allata de *Locusta* sont de type semi-centralisés⁴. Ils sont constitués de cellules glandulaires d'aspect identique enveloppées par une fine assise conjonctive ou «lamina basale» entre lesquelles s'insinuent des fibres nerveuses ordinaires et les prolongements des fibres neurosécrétrices émanant des cellules neurosécrétrices protocérébrales médianes (pars intercerebralis) incluses dans les nerfs paracardiaques internes (NCCI). L'ultrastructure des corpora allata chez les larves et les adultes de *Locusta* a été décrite par divers auteurs⁵⁻¹¹. Les cellules glandulaires présentent un cytoplasme d'opacité variable aux électrons. Toutefois, la majorité des auteurs semble convenir que ce caractère constitue plus un artefact qu'une différence structurale à mettre en rapport avec l'activité sécrétrice. Des travaux antérieurs¹¹ suggèrent qu'il existerait trois zones fonctionnelles structurellement différenciées dans ces cellules.

L'intoxication aiguë par le lindane de *L. migratoria*, tant au 5ème stade larvaire que chez les femelles en cours de premier cycle ovarien provoque des modifications ultrastructurales assez prononcées dans les corpora allata. Nous observons chez les individus intoxiqués une augmentation anormale du volume des espaces intercellulaires. Chez les larves du 5e stade, dont les corpora allata sont inactifs,



Lésions ultrastructurales provoquées par le lindane dans les corpora allata de *Locusta migratoria*.

Fig. 1. Corpora allata de témoins femelles adultes. Cytoplasme abondant, reticulum endoplasmique (RE), mitochondries (M), espaces intercellulaires (S). $\times 15,400$.

Fig. 2. Corpora allata de femelles adultes intoxiquées. Cytoplasme peu abondant, dilatation très marquée des espaces intercellulaires (S), noyau (N). $\times 7600$.

Fig. 3. Corpora allata de larves du 5e stade après intoxication. Vacuole (V) au centre des spires du reticulum endoplasmique (RE) avec dissociation des feuillettes, mitochondrie (M). $\times 29,200$.

Fig. 4. Corpora allata de femelles adultes après intoxication. Prolongements des fibres neurosécrétrices: grains de neurosécrétion altérés et d'opacité aux électrons variable. $\times 29,100$.

les espaces intercellulaires, normalement virtuels chez les témoins, deviennent dilatés. Ceux des femelles adultes aux corpora allata actifs s'hypertrophient de façon considérable par rapport aux individus normaux (figures 1, 2). Au niveau des cellules glandulaires, le lindane provoque diverses modifications tant nucléaires que cytoplasmiques. Les noyaux des cellules intoxiquées semblent diminuer de volume et leur enveloppe prend un aspect plissé alors qu'ils sont de forme régulièrement ovoïde chez les témoins. Par ailleurs, les amas de chromatine paraissent à la fois densifiés et dispersés dans le nucléoplasme. Les altérations qui paraissent les plus significatives se manifestent toutefois au niveau du cytoplasme. Phénomène très général après intoxication par les insecticides, nous constatons une modification des mitochondries qui semblent se dilater et se vacuoliser avec dissociation des crêtes.

D'importantes transformations s'observent dans le reticulum endoplasmique lisse des individus intoxiqués. Chez ces derniers, on constate systématiquement un aspect de type spiralisé, en « empreintes digitales » du reticulum tant au

5e stade que chez les adultes dont les corpora allata étaient en activité au moment de l'empoisonnement. La structure fine de ce reticulum spiralisé révèle aussi quelques différences significatives par rapport à celle du reticulum d'individus normaux au stade inactif. Ces différences tiennent en une dissociation des feuillettes qui paraissent discontinus alors qu'ils présentent une allure régulière chez les témoins. Cette destructuration peut être si marquée chez les individus intoxiqués que les feuillettes deviennent indistincts. Dans certains cas, il apparaît au centre des spires du reticulum lisse une vacuole qui semble dépourvue de paroi et provenant selon toute vraisemblance de sa désagrégation (figure 3).

Par ailleurs, il apparaît dans les cellules glandulaires intoxiquées un accroissement des structures lysosomiales, en particulier, des corps denses et des figures pseudomyéliniques. Les fibres neurosécrétrices montrent aussi diverses modifications en rapport avec l'intoxication. En sus de l'augmentation de la fréquence des structures lysosomiales et des lésions mitochondriales déjà observées après intoxi-

cation au lindane dans le système nerveux central de *Musca domestica*¹ et les corpora cardiaca de *Locusta*², nous remarquons une modification des grains de neurosécrétion. Chez les femelles adultes normales, les 4 types de fibres neurosécrétrices décrits par Cassier et Fain-Maurel¹⁰ renferment de nombreux grains de nature soit peptidique soit monoaminergique⁴. Au cours du cycle ovarien, ces grains sont denses dans leur immense majorité alors que dans les corpora allata des femelles inactives ou en fin de cycle, le contenu des grains deviendrait transparent¹¹.

Quel que soit le type de fibres considéré, nous remarquons aussi bien chez les larves du 5e stade que chez les femelles aux corpora allata actifs intoxiquées au lindane de profondes modifications. De façon générale, on constate une altération des grains. Les parois de certains d'entre eux paraissent se dissocier de sorte qu'ils se vident dans l'axoplasme environnant. En outre, la densité des grains décroît beaucoup lors de l'intoxication et les fibres de type IV ne renferment pratiquement que des grains «vides» même chez les femelles en cours de premier cycle ovarien (figure 4).

Discussion. Les modifications qui nous paraissent les plus importantes, quant à leur signification physiologique, parmi nos diverses observations, sont celles qui concernent le reticulum endoplasmique lisse et celles des terminaisons neurosécrétrices. En revanche, les altérations lysosomiales, mitochondriales et vacuolaires sont certainement non spécifiques car elles ont été décrites dans d'autres organes après action de diverses substances toxiques. Nos résultats sont à rapprocher de travaux récents relatifs au mode d'action du précocène chez le même insecte¹². Schooneveld étudiant les effets du précocène, un nouvel insecticide provoquant la mue imaginale de façon anticipée, observe des lésions

ultrastructurales chez *L. migratoria* au cours du 4e stade larvaire. En particulier, il observe une dilatation des espaces intercellulaires dans les corpora allata des insectes intoxiqués après 90 min d'intoxication qu'il met en rapport avec un arrêt d'activité de la glande. Nos propres recherches nous ont également conduit à mettre en évidence de telles altérations des espaces intercellulaires après intoxication par le lindane. Les modifications que nous avons décrites dans le reticulum endoplasmique dans les cellules glandulaires réputées actives au moment de l'intoxication par cet insecticide et les altérations ultrastructurales observées au niveau des feuillettes suggèrent que le lindane, lors de l'intoxication aiguë provoquerait une inhibition de l'activité glandulaire.

- 1 F. Ramade, *Annls Inst. nat. Agron. Paris* 5, 1 (1967).
- 2 B. Moreteau et F. Ramade, *Zool. Jb. Physiol.* 83, 340 (1979).
- 3 R. Pasquier, *Bull. Off. nat. anti-acridien Alger* 2, 5 (1947).
- 4 P. Cassier, *Int. Rev. Cytol.* 57, 1 (1979).
- 5 L. Joly, A. Porte et A. Girardie, *C. r. Acad. Sci. Paris* 265, 1633 (1967).
- 6 L. Joly, P. Joly, A. Porte et A. Girardie, *Archs Zool. exp. gén.* 109, 703 (1968).
- 7 L. Joly, P. Joly, A. Porte et A. Girardie, *Archs Zool. exp. gén.* 110, 617 (1969).
- 8 M.A. Fain-Maurel et P. Cassier, *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* 102, 543 (1969).
- 9 M.A. Fain-Maurel et P. Cassier, *C. r. Acad. Sci. Paris* 268, 2721 (1969).
- 10 P. Cassier et M.A. Fain-Maurel, *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* 111, 483 (1970).
- 11 M. Guelin et A. Darjo, *C. r. Acad. Sci. Paris* 278, 491 (1974).
- 12 H. Schooneveld, *Experientia* 35, 363 (1979).

Sodium and calcium action potentials in human anterior pituitary cells

S. Ozawa and T. Saito¹

Department of Physiology and Endocrinology and Metabolism, Jichi Medical School, Tochigi-ken 329-04 (Japan), 10 December 1979

Summary. Human anterior pituitary cells derived from a somatotropin-secreting adenoma were capable of generating action potentials with Ca^{2+} and tetrodotoxin-sensitive Na^{+} components. A major fraction of the action current was carried by Na^{+} ions.

Both normal and neoplastic anterior pituitary cells derived from rat and fish are capable of generating action potentials due to an increase in the membrane permeability to Ca and Na ions²⁻⁴. Because release of secretory products is initiated by Ca influx in most secretory cells, the Ca component of the action potential has been suggested to play a role in the control of secretion of anterior pituitary hormones⁵⁻⁸. Biales et al.² have shown that human anterior pituitary cells also generate action potentials with a Na component. However, the detailed ionic mechanism of the action potential remains to be determined. This paper reports that action potentials in human pituitary cells have both Ca and tetrodotoxin-sensitive Na components and that the latter is dominant for spike initiation.

Material and methods. Human pituitary cells were obtained from an adenoma removed by transsphenoidal surgery in a 64-year-old woman who had developed typical symptoms of acromegaly during the last 16 months. The resting level of growth hormone in plasma determined by radioimmunoassay ranged from 26.4 to 106 ng/ml. This value is 10–50 times higher than in normal adults. Electron microscopical

survey revealed that the entire cytoplasm of the cells in the adenoma tissue was filled with round dense secretory granules. The diameter of the granules was 344 ± 6 nm (mean \pm SEM $n=77$). The cell suspension was prepared according to the method of Vale et al.⁹. The cells were grown in 35×10 mm Falcon dishes containing 2 ml of Ham's F-10 medium supplemented with 15% horse serum and 2.5% fetal bovine serum. The experiments were conducted 1–7 days after plating. During this period the cells were round-shaped and attached to the bottom of the dish. Intracellular recording and current injection using a bridge circuit were done as described previously¹⁰ in a standard solution of the following composition (mM): NaCl 138, KCl 5, CaCl_2 10, MgCl_2 1.3, glucose 10 and either Hepes- NaOH or Tris- HCl buffer 5 at pH 7.4. In some experiments the Ca^{2+} concentration was reduced to 2.4 mM by increasing Na^{+} on an isotonic basis. Na -free solution was prepared by substitution of choline for Na^{+} . Tetrodotoxin (TTX) was applied by pressure ejection from a 5- μm -tip micropipette filled with recording medium containing 15 μM TTX. The tip of the pipette was transiently located