50376 1963

MEMOIRE PRESENTE

A LA FACULTE DES SCIENCES DE LILLE
POUR L'OBTENTION
DU DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES

50376 1963 61

Par M<sup>lle</sup> Catherine SANTONI

(Mention Sciences Naturelles)

ÉTUDE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE
DES MITOCHONDRIES DU FOIE DE RAT.
MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES
SOUS L'INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS
D'ORDRE PHYSIOLOGIQUE
ET PATHOLOGIQUE





Présenté le 19 Juin 1963 devant la commission d'examen

Président : M. M. DURCHON

Examinateurs: MM. E. VIVIER et J. MONTREUIL

#### Ce travail a été réalisé

dans le Laboratoire des Hétéroprotéides (Professeur J. MONTREUIL) du Service de Biochimie Cellulaire (Professeur P. BOULANGER).

et dans le Laboratoire de Microscopie Electronique (Professeur Agrégé A. DUPONT) du Service de Biologie Cellulaire (Professeur J. DRIESSENS)

de l'Institut de Recherches sur le Cancer de LILLE.

INTRODUCTION		p.	1
HISTOR	RIQUE		
I - MORPHOLOGIE AU MICROSCOPE O	PTIQUE DES MITOCHONDRIES DU FOIE		
DE RAT NORMAL		p.	
II - BIOCHINIE DES MITOCHONDRIES	NORMALES	p.	8
III - LA MITOCHONDRIE DU FOIE DE	RAT NORMAL AN MICROSCOPIE		
ELECTRONIQUE			
A - STRUCTURE GENERALE DES MITOCHONDRIES		р.	12
1 - La membrane mitochondriale		-	12
2 - Les crêtes internes		p.	14
3 - La matrice		p.	15
4 - Variations des mi	tochondries selon le type		
cellulaire		p.	15
5 - Corrélation entre	la biochimie des mitochondries		
et leur structure	décrité au microscope électro-		
nique		p.	16
B - LA MITOCHONDRIE DU FOIE	DE RAT	p.	18
1 - Ultrastructure		p.	18
2 - La mitochondrie dans la cellule hépatique du Rat		p.	19
3 - Organites cellula	ires se rattachant aux		
mitochondries		p.	20
a) les microbo	dies	p.	21
b) les lysosom	les	p.	22
C - LA MITOCHONDRIE DU FOIE	normal dans les etats/hysio-		
LOGIQUES PARTICULIERS		p.	24
1 - Mitochondries du	foie d'un Rat hépatectomisé	p.	24
2 - Mitochondries dan	s le foie qui régénère après		
hépatectomie		p.	24

3 - Les mitochondries au stade embryonnaire.

p. 25

IV - LA MITOCHONDRIE A L'ETAT PATHOLOGIQUE	p. 26
A - L'HEPATITE TOXIQUE	p. 27
1 - Intoxication par les colorants azofques	p. 27
2 - Intoxication par le tétrachlorure de carbone	p. 27
3 - Intoxication par le phosphore	p. 29
B - L'HEPATITE CARENTIELLE	p. 29
1 - Influence du jeûne	p. 29
2 - Influence d'un régime déficient	p. 30
C - L'HEPATOME	P, 30
1 - L'hépatome solide	p. 30
2 - 1'Hépatome ascitique	p. 34
TRAVAUX PERSONNELS	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
Matériel	p. 40
Méthodes	p. 41
1) microscopie optique	p. 41
2) microscopie électronique	p. 42
RESULTATS	
I - LE FOIE NORMAL	p. 44
II - HEPATITE AU TRYPAN BLEU	p. 46
III - HEPATITE PROVOQUEE PAR LE COLORANT AZOIQUE	p. 47.
IV - L'HEPATONE AZOIQUE	p. 48
V - L'HEPATOME ASCITIQUE	p. 51

p. 52

DISCUSSION - CONCLUSION

La cellule, comme l'ont énoncé SCHLEIDER et SCHWANN en 1839, est l'unité fondamentale de la matière vivante. Ceci est vrai à la fois du point de vue morphologique et du point de vue biochimique.

Le contenu de la cellule n'est pas homogène. La cellule, limitée par une membrane, renferme dans son cytoplasme des inclusions qui diffèrent les unes des autres par leur forme, leurs propriétés chimiques, leur rôle, leur origine, mais qui unissent leur activité pour concourir au bon fonctionnement de la cellule.

La diversité des inclusions cellulaires a été révélée tout d'abord par la microscopie optique. Celle-ci, bientôt perfectionnée par l'emploi de techniques cytochimiques, a permis de mettre en évidence dans la cellule le noyau et son nucléole, des granulations et des bâtonnets qui sont les mitochondries, des corpuscules osmiophiles, l'appareil de Golgi, ainsi que des formations basophiles appelées ergastoplasme. La mise au point du microscope à contraste de phase a permis, par la suite, de mieux connaître les mitochondries.

Depuis 1945, l'emploi du microscope électronique pour l'observation de coupes ultrafines de tissus a permis de déceler l'ultra-structure des organites cellulaires déjà observés et de découvrir des formations qui avaient échappé à l'investigation du microscope optique. C'est ainsi qu'ont été observés les microsomes (ou ribosomes). Ceux-ci peuvent être libres dans le cytoplasme ou border extérieurement les lamelles doubles de l'ergastoplasme. On les appelle alors grains de PALADE. L'ergastoplasme, caractérisé par la présence des ribosomes sur ses parois, est lui-même sans doute une différentiation du reticulum endoplasmique, système de doubles membranes qui parcourent la cellule.

. . . . . .

L'existence de ces entités morphologiques que sont les noyaux, les mitochondries et les microsomes a été confirmée par une technique mise au point par des biochimistes : le <u>fractionnement cellulaire</u>. Un broyat tissulaire dilué dans un milieu approprié libère dans ce liquide par rupture mécanique des membranes cellulaires les différents constituants cytoplasmiques. Ceux-ci diffèrent par leur taille et leur densité, ce qui permet de les isoler ensuite les uns des autres par une centrifugation fractionnée. Cette technique a permis l'isolement des noyaux, des mitochondries, de la fraction microsomale (constituée, comme l'a montré le microscope électronique, de grains de PALADE et de membranes cytoplasmiques) et du suc cellulaire.

Les différentes fractions ainsi obtenues ont fait l'objet d'études morphologiques, mais aussi d'analyses biochimiques qui ont montré qu'à chaque fraction morphologiquement distincte correspondaient des propriétés biochimiques particulières. Ainsi les noyaux contiennent tous les acides désoxyribonucléïques (ADN) de la cellule, tandis que le nucléole et les microsomes sont très riches en acides ribonucléiques (ARN). Quant aux mitochondries, elles possèdent de très nombreux enzymes parmi lesquels des enzymes respiratoires et les enzymes du cycle de KREBS.

Les mitochondries jouent donc dans la cellule un rôle métabolique prépondérant. C'est pourquoi nous nous attacherons particulièrement dans ce travail à leur étude. Nous envisagerons leur morphologie au microscope électronique dans des cellules normales et dans des cellules pathologiques (tout particulièrement des cellules cancéreuses) en pensant qu'une meilleure connaissance de leur ultrastructure peut contribuer, avec des études biochimiques, à mieux connaître leur fonctionnement. Nous rechercherons spécialement si une modification mitochondriale est susceptible d'apporter un éclaircissement au problème de la cancérisation cellulaire.

L'organe choisi pour cette investigation a été le foie de rat. Le rat est un animal très utilisé dans les laboratoires pour sa petite taille et son élevage facile. Son foie a fait l'objet de nombreuses études morphologiques ou biochimiques. Il est donc bien connu et de plus il est facilement cancérisé.

. . . . .

. . . . . .

Dans cette étude de la mitochondrie du foie, nous avons d'abord fait le point des commaissances acquises sur cet organite cellulaire au moyen de la microscopie optique et donné un aperçu de son rôle biochimique. Nous avons ensuite accordé une place importante aux apports récents de la microscopie électronique en ce qui concerne le foie normal et le foie pathologique. Nous avons enfin présenté le résultat de nos propres observations au microscope électronique sur les mitochondries du foie normal, du foie de rats intoxiqués par le bleu trypan et le 5'-méthyl-diméthylaminoazobenzène (ɔ'-Me-DAB) et les mitochondries des cellules de différents hépatomes.

HISTORIQUE

#### I - MERPHOLOGIE AU MICROSCOPE OPTIQUE

DES MITOCHONDRIES DU FOIE DE RAT NORMAL

Avant d'aborder la revue des travaux de microscopie électronique sur les mitochondries du foie de rat, nous rappellerons quel était, au moment où ont commencé ces recherches, l'état des connaissances sur la morphologie et la biochimie des mitochondries.

#### MORPHOLOGIE DES MITOCHONDRIES REVELEE PAR LE MICROSCOPE OPTIQUE\*

Les granulations cytoplasmiques que nous appelons mitochondries ont été observées à la fin du siècle dernier par quelques chercheurs dans des cellules fraiches. Elles ont été colorées pour la première fois en 1890 par ALTMAN. Cet auteur met en évidence, au moyen de fuchsine et d'acide picrique des grains et des bâtonnets qu'il appelle bioblastes. Le terme de mitochondrie (du grec mitos = filament, et chondros = granule) a été introduit par BENDA (1898) qui colore ces organites par l'alizarine et le cristal violet.

La plupart des connaissances acquises depuis lors au moyen du microscope optique sont devenues classiques.

Les mitochondries peuvent être colorées vitalement. Ces réactions sont dues à la présence d'enzymes oxydants. Ce sont : (52)

1 - La réaction de "G-Nadi" où la cytochrome oxydase, en présence d' α-naphtol, oxyde la dimethylphénylènediamine en bleu d'indophénol. Il convient de signaler toutefois que le bleu d'indophénol est soluble dans les lipides. C'est pourquoi cette réaction ne convient pas aux localisations intracellulaires.

<sup>\*</sup> Nous avons consulté les précis d'Histologie et de Cytologie de BOUIN (9), CHEVREMONT (12) et VERNE (84)

2 - La coloration au vert Janus B -

Celui-ci est réduit dans la cellule par les enzymes de deshydrogénation flavoprotéiques. Mais il est réoxydé en forme bleue au niveau des mito-chondries à cause de la richesse de celles-ci en cytochromes et en cytochrome oxydase.

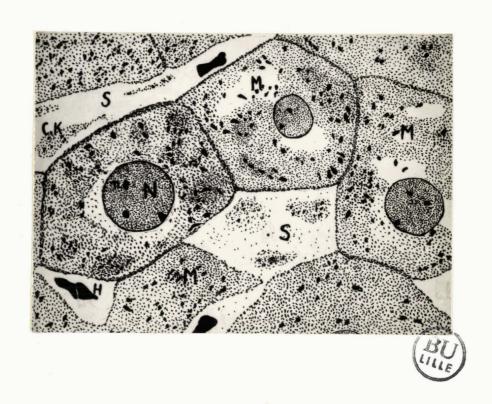
- a été critiquée par BRENNER (1953) (10) et FREDERIC (1958) (28).
- 3 <u>La réduction du tétrazolium en formazan</u> par les deshydrogenases des mitochondries.

Les mitochondries peuvent également être colorées sur coupes apres fixation. Mais le mécanisme de la réaction est moins commu que dans le cas des colorations vitales. Les fixateurs mitochondriaux sont à base de chrome et d'osmium (bichromate de potassium, acide chromique ou acide osmique). Les colorants contiennent de l'hématoxyline ferrique (technique de REGAUD) (Fig. 1), du violet cristal, de la fuchsine acide ou anilinée (technique de VOLKONSKY).

L'ensemble des corpuscules ainsi mis en évidence a été appelé d'une façon générale chondriome. Chaque élement du chondriome est un chondriosome. Les chondriosomes en forme de grains de 0,2  $\mu$  à 1,6  $\mu$  sont appelés mitochondries ; les filaments allongés sont les chondriocontes ; on observe aussi parfois des chapelets de grains ou chondriomites.

Motons que l'existence de ces différents aspects du chondriome fait problème car au microscope électronique on ne les a pas retrouvés. La raison en est sans doute la finesse des coupes de microscopie électronique qui ne permet pas de sectionner l'un de ces organites dans son ensemble car les filaments sont recoupés plusieurs fois sur une même coupe de microscopie électronique.

Les chondriosomes cont été étudiés dans la cellule vivante grâce à la microcinématographie en contraste de phase de cultures de tissus (il s'agit souvent de coeur ou de muscle d'embryon de poulet). De telles études ont été réalisées, entre autres, par CHEVREMONT.



Foie de rat normal.

Mise en évidence du chondriome après fixation et coloration par la méthode de REGAUD.

 ${\mathbb N}$  : noyau ; n : nucléoles ;  ${\mathbb N}$  : mitochondries.

S : sinusofde ; H : hématie ; CK : cellule de KUPPFER

. . . . . .

Les chondriosomes sont mobiles, ils se déplacent dans la cellule, leur forme peut se modifier en quelques minutes : ils se ramifient, forment des réseaux, s'amincissent en certains/points. En outre, les filaments peuvent se transformer en grains. Ces modifications sont sans doute en rapport avec le métabolisme cellulaire.

<u>Dans le foie</u>, le chondrione présente quelques particularités mises en évidence par NOEL (48). Cet auteur a distingué dans le lobule plusieurs zones où le chondrione présente des aspects différents.

Dans la zone centrale du lobule, autour de la veine centrolubulaire, le chondriome est filamenteux. Dans la zone périphérique, autour des espaces de KIERNAN, le chondriome est formé de grains et de grosses mitochondries. Dans la zone moyenne, les chondriosomes ont une forme intermédiaire.

Parallèlement à cette observation, NOEL a remarqué qu'après un repas, les produits de la digestion s'accumulaient tout d'abord dans les cellules de la périphérie du lobule et que les cellules de la zone moyenne entraient ensuite seulement en activité. Les cellules centrales fonctionnent rarement.

Il semble donc que la fragmentation du chondriome se rencontre dans les cellules hépatiques en période d'activité digestive intense.

## II - BIOCHIMIE DES MITOCHONDRIES

#### NORMALES\*

Les mitochondries, de constitution lipoprotéinique, possèdent la plupart des enzymes des respirations cellulaires. C'est ce qui fait leur importance et explique l'intérêt qu'elles suscitent. En effet, les respirations fournissent aux organismes l'énergie nécessaire à l'accomplissement des différentes fonctions vitales. La découverte des enzymes respiratoires est récente et la détermination de leur localisation dans les mitochondries est plus récente encore.

L'existence d'enzymes respiratoires n'a été décelée que tres progressivement. Au début du XXe siècle, WARDURG, étudiant l'oxydation in vitro d'aminoacides, constata que la réaction n'avait lieu que lorsque l'oxygène était activé par du fer. Il découvrit ensuite dans l'organisme une substance hémique (renfermant donc du fer) qui jouait un rôle analogue vis-à-vis de l'oxygène. Il l'appela "Atmungsferment" ou ferment respiratoire.

A la même époque d'autres chercheurs, THUNBERG en Suède et WIELAND en Allemagne, découvrirent d'autres enzymes, les <u>deshydrogénases</u>, qui oxydent les substances organiques par deshydrogénation en absence d'oxygène. L'oxygène ne serait qu'un simple accepteur d'hydrogène.

C'est seulement aux environs de 1920 que les trávaux de l'Anglais KEILIN donnèrent une idée plus complète des phénomènes d'oxydation cellulaire

<sup>\*</sup> Nous avons consulté les revues générales de GREMN (31) (32)

. . . . .

et du rôle des enzymes respiratoires. KEILIN découvrit que l'hydrogène enlevé aux substrats par les deshydrogénases n'était pas cédé directement à l'oxygène mais qu'il réduisait des composés intermédiaires appelés cytochromes. Les cytochromes renferment du fer dans lour molécule et la réduction les fait passer de l'état ferrique à l'état ferreu par perte d'un électron .

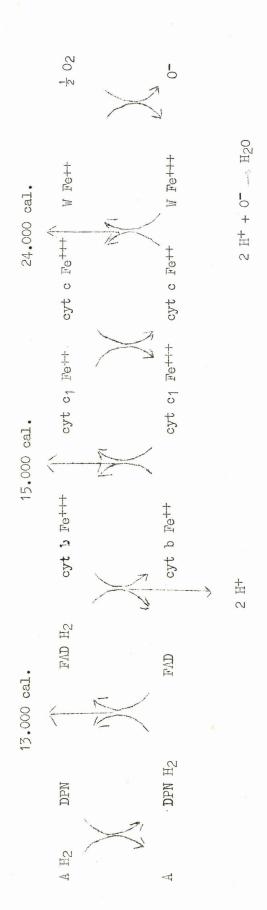
Il existe différents cytochromes. Le premier d'entre eux se réduit en oxydant la deshydrogénase porteuse d'hydrogène (l'hydrogène passe à la forme ionique H<sup>+</sup>) Il est oxydé à son tour au contact d'un second cytochrome qui passe alors à la forme réduite. Il y a, d'un cytochrome à l'autre, un véritable "transfert d'électrons".

Ces cytochromes ne sont que des transporteurs d'électrons (les électrons passent de l'un à l'autre par un mécanisme qui n'est pas encore connu). Toutefois l'un d'eux a la propriété de céder son électron à l'oxygène et ainsi de l'activer en le faisant passer à la forme ionique . C'est la cytochrome oxydase que KEILIM a encore appelée enzyme de WARBURG car elle remplit exactement les propriétés que cet auteur attribuait au "ferment respiratoire".

L'ensemble des réactions ainsi mises en evidence par KEILIL constitue "la chaine des oxydations cellulaires". Certaines des réactions de cette chaîne libèrent de l'énergie, ce qui est illustré dans la figure 2.

Que devient l'énergie libérée ? Elle est stockée sous forme de liaisons à haut potentiel énergétique. BELITZER et KALCKAR découvrirent que les oxydations cellulaires permettaient la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP) par création d'une liaison pyrophosphate fortement énergétique. Plus tard, on constata que cette phosphorylation oxydative était "couplée" à la chaîne de transfert des électrons, mais le mécanisme de ce "couplage" n'est pas encore complètement élucidé à l'heure actuelle.

. . . . .



Chaîne -DPN- cytochrome c - oxydase.

A = substrat

AH2 = substrat réduit

DPN = diphosphopyridine nucléotide

FAD = flavine-adénine-diphosphate

cyt b Fe+++ = cytochrome b sous sa forme

oxydée cyt b Fe<sup>++</sup> = cytochrome b sous sa forme réduite

W Fe+++ = cytochrome oxydase ou "ferment

rouge" réspiratoire de WARBURG

Ainsi l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule est fournie par une suite de réactions qui commencent par la deshydrogénation de différents substrats. Quels sont les substrats ainsi oxydables ? Ce sont les produits de la dégradation des substances plastiques. Les glucides et les lipides sont dégradés en acide acétique. KREBS découvrit que cet acide acétique s'unissait à l'acide oxaloacétique et qu'il était entraîné dans un cycle de réactions qui aboutissent à la dégradation de l'acide acétique et à la resynthèse de l'acide oxaloacétique (figure 3). Au cours de ce cycle, du gaz carbonique se dégage et de l'hydrogène est cédé aux enzymes de deshydrogénation.

Quant aux protides, ils se dégradent en acides aminés qui, par différentes réactions de conversion, se rattachent aux acides du cycle de KREBS et à l'acide pyrivique.

Les réactions du métabolisme des substances plastiques et du cycle de KREBS, ainsi que les réactions de la chaîne des oxydations cellulaires et de la phosphorylation oxydative nécessitent l'intervention d'enzymes.

GREEN, aux environs de 1947, observa que ces enzymes étaient toujours isolés de la cellule en proportions constantes. Il pensa qu'ils constituaient, à l'intérieur de la cellule, un complexe et donna à ce complexe le nom de cyclophorase car les enzymes du cycle de KREBS en étaient un élément important.

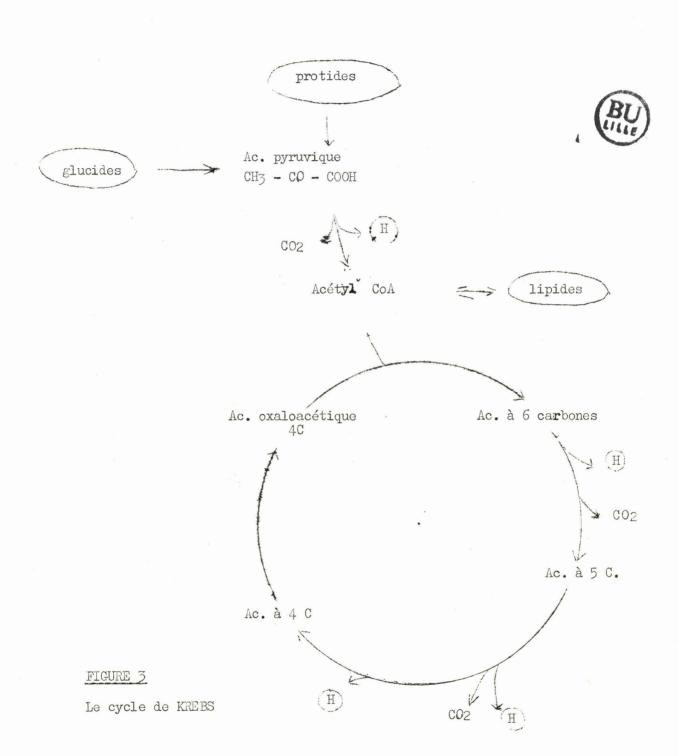
C'est à cette époque que les procédés de fractionnement cellulaire, mis au point par CLAUDE, permirent d'isoler de la cellule les mitochondries.

En 1949, SCHNEIDER et POTTER, LEHNINGER et KENNEDY prouvèrent que les propriétés attribuées à la cyclopyorase étaient supportées par les mitochondries et l'on utilise actuellement l'expression : système cyclophorase - mitochondries.

On pourrait alors se demander si les enzymes étaient disposés au hasard, ou, au contraire, s'ils possédaient une <u>organisation</u> à l'intérieur de la mitochondrie.

Plusieurs faits firent pencher GREEN en faveur de la seconde hypothèse. En effet, les enzymes mitochondriaux s'isolent beaucoup moins facilement que les

. . . . . .



autres enzymes de l'organisme. C'est le cas, par exemple, des enzymes de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Plusieurs enzymes interviennent successivement dans la suité de réactions qui aboutit à la  $\beta$ -oxydation. Or chacun d'eux ne peut jamais être isolé à l'état pur mais il est toujours contaminé par celui qui le précède et par celui qui le suit immédiatement dans la chaîne des réactions. Ceci suggère l'idée que les enzymes de la  $\beta$ -oxydation sont fortement liés les uns aux autres et possèdent un arrangement qui leur permet de remplir leur rôle avec une efficacité maximale.

Il en est de même pour d'autres systèmes enzymatiques mitochondriaux deshydrogénases des acides gras, enzymes du cycle de KREBS et enzymes de la glycolyse.

Le rôle des grosses molécules de protéines associées aux coenzymes fonctionnels s'expliquerait alors. Elles unissent les uns aux autres les différents enzymes et conditionnent leur arrangement dans la mitochondrie.

Certains ions métalliques interviendraient, en outre, pour lier les uns aux autres différents systèmes enzymatiques. L'ion Mm<sup>++</sup> lierait les enzymes des oxydations aux enzymes de la phosphorylation oxydative (LTNDBERG et ERNSTER) (43). Par l'intermédiaire d'un ion métallique ésalement, un diphosphopyridine nucléotide pourrait servir de groupement fonctionnel à deux enzymes différents : Les deshydrogénases de l'acide lactique et du triose phosphate.

Ces résultats semblent bien prouver qu'il existe une organisation des enzymes mitochondriaux. L'étude des mitochondries au microscope électronique va apporter une confirmation d'ordre morphologique à cette hypothèse.

# III - LA MITOCHONDRIE DU FOIE DE RAT NORMAL EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

L'usage du microscope électronique en biologie s'est répandu vers 1945. Aux environs de 1950, les perfectionnements apportés aux microtomes permirent d'effectuer des coupes ultrafines de tissus et firent progresser l'étude des ultrastructures cellulaires.

Nous nous proposons de passer d'abord en revue les connaissances générales acquises peu à peu sur les mitochondries; puis nous insisterons davantage sur les particularités des mitochondries du foie de Rat. Dans cette étude, nous avons fait de larges emprunts à la revue de ROUILLAR (1960) (70).

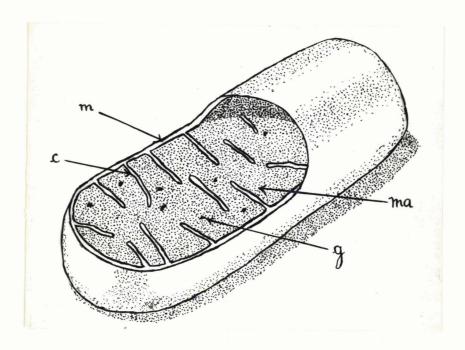
#### A - STRUCTURE GENERALE DES MITOCHONDRIES -

Une mitochondrie est limitée par une membrane. Elle possède des crêtes internes et une substance interne ou matrice (figure 4).

#### 1 - LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE

L'existence d'une membrane individualisant la mitochondrie du reste du cytoplasme a été décelée dès 1945 par CLAUDE et FULLAN (13) sur des mitochondries isolées.

Ce résultat fut confirmé par les travaux de DALTON (1949) (16). Cet auteur isola en effet des mitochondries par centrifue ation différentielle d'homogénats de foie de rat. Ces mitochondries obtenues dans différents milieux, salins, physiologiques, ou dans du sucrose 0,88 m, furent déposées sur des membranes de formvar, fixées à l'acide osmique et observées au microscope électronique. Sur certaines préparations, l'auteur put observer des mitochondries





Reconstitution schématique d'une mitochondrie qui a été partiellement sectionnée afin de montrer la structure interne.

m = membrane

c = crête

ma = matrice

g = granulation interne

. . . . . .

dont la membrane rompue laisse échapper le matériel qu'elles renfermaient.

GLIMSTEDT, LAGERSTEDT et LUDWIG firent une observation analogue en 1954 (30) (Figure 5).

En 1952-1953, PALADE (58 et 59) et, en 1953) SJUSTRAND (76) réussirent à effectuer des coupes de tissus. Dans les préparations ainsi obtenues, il leur fut possible d'observer les détails de structure des organites cellulaires. Ces áuteurs constatèrent, en outre, que la membrane était double car elle apparaissait constituée de deux feuillets de forte densité électronique séparés par un espace moins dense.

PALADE (1956) (60) appela le feuillet externe, qui est au contact du hyaloplasme, membrane externe ou membrane limitante. Il dénomna le feuillet interne, membrane interne; l'espace limité par ces deux feuillets, chambre externe; et l'intérieur de la mitochondrie, limité par la membrane interne, chambre interne.

SJUSTRAND (1956) (77) proposa les termes de couche osmiophile pour chaque feuillet dense et d'éspace interne osmiophobe pour l'espace que délimitent ces feuillets.

ROUILLER (1960) (70) adopta les termes de :

membrane limitante, membrane interne, chambre extorne, chambre interne.

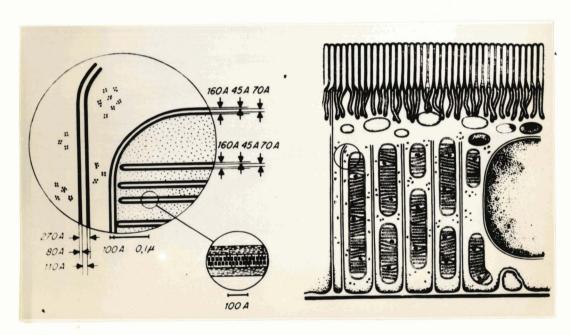
Il faut noter que, quelle que soit la terminologie employée, l'accord est parfait entre tous les auteurs à propos de l'ultrastructure de la membrane.

SJOSTRAND mesura, en 1956, l'épaisseur des différentes • ouches. L'épaisseur totale de la membrane est de 140 à 180 Å. Chaque couche dense a

. . . . . .



Mitochondrie éclatée et étalée. La membrane mitochondriale a un aspect granuleux. La grande tache blanche inférieure est constituée par le "chondrioplasme". (d'après MUHLETHALER) (47)





#### FIGURE 6

Mesures de l'épaisseur des membranes mitochondriales et cytoplasmiques dans les cellules à bordure en brosse de la partie proximale des tubes contournés du rein. (d'après 3JOSTRAND) (78)

.....

une épaisseur de 35 à 60 Å et la chambre externe une épaisseur de 40 à 70 Å. (figure 6).

Tout récemment enfin (1962), CHANDRA (11), observant des mitochondries "in situ" et des mitochondries isolées de foies de Rat et de cobaye, a constaté que la membrane mitochondriale présentait des "renversements" (le terme anglais employé est celui de "reversal"), c'est-à-dire qu'en différents points de cette membrane le feuillet dense interne se continue en un feuillet externe (figure 7). La couche externe et la couche interne qui ne participent pas au "renversement" se terminent par une extrémité libre mais participent à un autre "renversement" situé en un autre point de la mitochondrie.

Cette disposition expliquerait que les mitochondries, qui conflent dans certaines circonstances, puissent le faire sans se rompre. En effet, les deux feuillets constitutifs de la membrane peuvent glisser l'un sur l'autre. Elle permettrait aussi des échanges directs entra la chambre interne de la mitochondrie et le hyaloplasme environment.

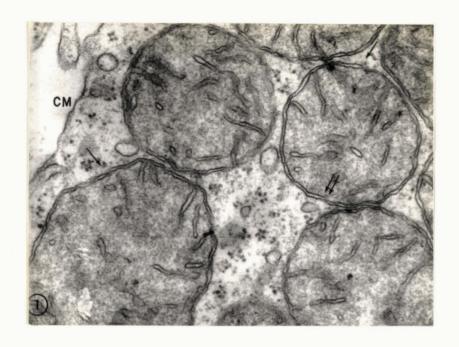
#### 2 - LES CRETES INTERNES

La microscopie électronique qui a permis d'observer le caractère double de la membrane mitochondriale a également permis de découvrir un élément tout à fait caractéristique de la mitochondrie : les crêtes internes. PALADE 1952 (58) observa des sortes de cloisons internes issues de la membrane, généralement perpendiculaires au grand axe de la mitochondrie et la traversant dans une partie ou la totalité de sa largeur. Il les appela "crêtes mitochondriales" ou cristae. Pour l'auteur (1955-1956) (59-60), ces crêtes sont des replis du feuillet interne de la membrane avec lequel elles sont en continuité.

Les premières observations de SJUSTRAND (1953) (70) ne sont pas en accord complet avec celles de PALADE.

En effet, SJUSTMAND observe les crêtes, mais pour lui il ne s'agit là que d'une simple connexion topographique et non d'une continuité entre les crêtes

. . . . . .





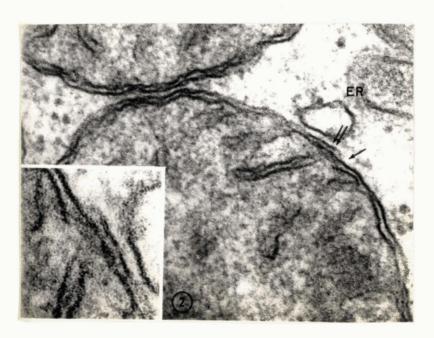


FIGURE 7

Mitochondries de foie de Rat normal <u>in situ</u> (d'après CHANDRA) (11)

CM = membrane cellulaire - ER = reticulum endoplasmique

Les flèches indiquent le point de "rupture" de la membrane externe

 $<sup>(1) \</sup>times 60.000$ 

<sup>(2)</sup> x 160.000 (dans le coin à gauche : x 320.000)

. . . . . .

et la membrane. Cette divergence d'interprétation entre les deux auteurs n'a été que momentanée car, depuis, SJÜSTRAND a observé lui aussi une continuité entre crêtes et membrane interne.

Les crêtes sont constituées, comme la membrane, de deux feuillets denses délimitant un espace moins dense. Les feuillets denses sont en continuité avec la membrane interne et l'espace clair contenu entre les feuillets denses est en continuité avec la chambre externe.

Les mesures effectuées par SJUSTRAND (1956) (77) ont donné (figure 6) :

160 à 210 A pour l'épaisseur totale des crêtes,

40 à 70 Å pour chaque couche dense,

40 à 80 Å pour l'espace contenu entre les deux couches denses.

#### 3 - LA MATRICE

La chambre interne de la mitochondrie est occupée par la matrice qui apparaît plus ou moins dense selon l'orisine des mitochondries. Cette matrice est composée de <u>petites granulations de 40 à 50 Å de diamètre</u> (HHODIN 1954) (67) (LOW -1956) (44).

On y trouve également des granules très opaques qui ont en moyenne 300 Å de diamètre (BERNHARD et ROUILLER -1956) (8); (WEISS - 1955) (80). Le nombre de ces granules varie avec le type de mitochondrie.

## 4 - VARIATIONS DES MITOCHONDRIES SELON LE TYPE CELLULAIRE

La structure générale des mitochondries que nous venons de décrire présente des variations selon l'origine de la mitochondrie étudiée.

Ainsi dans les mitochondries des <u>cellules à bordure en brosse du rein</u>, les crêtes sont très nombreuses (figure 8).

Ce sont des cloisons doubles qui traversent les mitochondries dans toute leur largeur et qui sont à peu près parallèles les unes aux autres (SJUSTRAND et RHODIA - 1953) (78).



Mitochondrie de cellule rénale (d'après SJOSTRAND)

Les crêtes sont disposées parallèlement les unes aux autres et traversent le corps mitochondrial dans toute sa largeur. On voit nettement ici la structure double de la membrane limitante et des crêtes internes.

RHODIN (1954) (67) signale dans ces mitochondries, la présence de orêtes ramifiées et anastomosées. Il observe, en outre, des granules denses nombreuses qui lui paraissent être en rapport avec le transit important d'eau et de sels minéraux à travers les cellules des tubes contournées du rein.

Chez les <u>Protozoaires</u>, les crêtes internes sont également nombreuses, mais présentent l'aspect de tubules issus de la membrane qui atteignent environ la moitié de la largeur de la mitochondrie. En coupe, apparaissent de nombreuses sections longitudinales et transversales de ces tubules. La membrane mitochondriale n'est pas toujours continue chez la Paramécie. WOHLFARTH-BOTTEMMAN (1956) (99) signale l'existence de points de ruptures de la membrane par lesquels les crêtes sont expulsées dans le cytoplasme. Les granules denses sont rares (DALTOM et FELIX - 1957) (15) (figure 9).

## 5 - CORRELATION ENTRE LA BIOCHIMIE DES MITOCHONDRIES ET LEUR STRUCTURE DECRITE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE \*

L'analyse chimique des mitochondries a montré qu'elles étaient constituées de lipoprotéines.

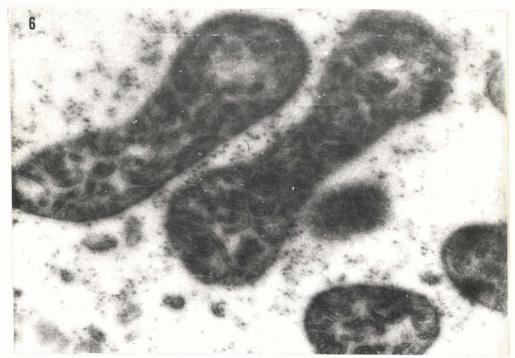
Où lipides et protides sont-ils situés dans les structures que nous venons de décrire ? Et quel est leur rôle ?

Les lipides qui entrent dans la composition des membranes cellulaires et de la membrane mitochondriale sont pour la plupart des <u>phospholipides</u>. D'une manière générale, les lipides sont osmiophiles, mais dans des molécules complexes comme les phospholipides, certains pôles hydrophiles ne réduisent pas l'acide osmique et peuvent paraître clairs au microscope électronique.

L'existence de pôles hydrophobes et hydrophiles permet l'orientation des molécules de phospholipides. Dans les figures myéliniques, structures

<sup>\*</sup> Nous avons fait ici de larges emprunts à la revue générale de POLONOVSKI (63).





## FICURE 9

Mitochondrie de Protozosire (d'après MOVINOFF (52) Les crêtes sont ici de fins tubules dont on observe de nombreuses sections longitudinales ou transuersales dans tout le corps de la mitochondrie.

(x 24.000)

constituées par l'empilement de lipides, STOLCKENTUS (79) a pu montrer que deux rangées de molécules lipidiques s'accolaient par leur pôle hydrophobe et, au contraire, s'écartaient des rangées voisines par leur pôle hydrophile. Une telle disposition expliquerait l'alternance de couches claires et de couches denses au microscope électronique.

Il y a tout lieu de croire qu'une disposition analogue se retrouve dans la membrane des mitochondries et STOECKENIUS a proposé le schéma d'ultrastructure suivant : la membrane mitochondriale comprend deux couches lipidiques constituées chacune par deux rangées de molécules plus ou moins entremêlées, bordées extérieurement par une couche protéique qui elle-même peut pénétrer dans la couche lipidique (figure 10).

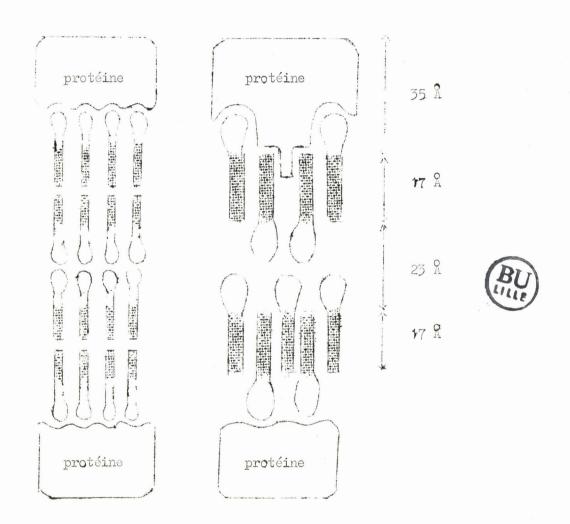
Les coenzymes seraient portés par des lipoprotéines. Ceci a une grande importance. En effet, l'existence de deux phases, protidique et lipidique, facilite et criente les réactions enzymatiques. Ainsi, au cours de la réaction enzymatique, la molécule de substrat peut changer d'affinité pour l'une ou l'autre phase et modifier sa position.

Le coenzyme peut écalement acquérir ou perdre certains pôles hydrophiles ou hydrophobes et s'enfoncer plus ou moins dans la lipoprotéine. La molécule de substrat est attirée ou repoussée. Il en résulte à nouveau une modification de sa position qui lui permet de subir l'action de l'enzyme voisin. La succession des réactions enzymatiques est alors commandée par la position des enzymes les uns par rapport aux autres.

La présence de deux phases permet encore d'expliquer les réactions endergoniques. Le potentiel d'oxydo-réduction d'une substance peut être différent dans la phase protidique et dans la phase lipidique, S'il est inférieur dans la phase lipidique, lors du passage de la phase protidique dans la phase lipidique, on peut penser que la différence de potentiel est récupérée dans une réaction endergonique comme une phosphorylation.

Il a été enfin prouvé que les enzymes seuls (protéine + coenzyme) ne permettent pas d'accomplir toutes les réactions enzymatiques supportées par les mitochondries. C'est ainsi que l'action des détergents qui dissocient lipides

.....



Disposition supposée des molécules de protéines et de lipides à l'intérieur de la membrane mitochondriale. (en hachuré : les pôles osmiophiles des molécules de phospholipides) (d'après POLONOVSKI) (63)

et protides découple la phosphorylation de la chaîne des oxydations cellulaires. C'est ainsi également que le transport des électrons ne peut s'effectuer en l'absence de lipides. GRAEN (33 - 34) a pu détruire les mitochondries par sonage ou ultrasonage et obtenir des particules qu'il a appelées ETP (electron transfering particles). Ces particules possedent la chaîne des enzymes d'oxydation du succinate et du diphophopyridine nucléotide réduit (DPNH). En outre, si elles possèdent des fragments de double membrane, elles peuvent coupler les phosphorylations aux oxydations à condition d'ajouter du magnésium Me

Par action du desoxycholate ces particules ont pu être dissociées en perticules rouges (SDC = succinic - DPNH - b - c - deshydrogenase complex) et en particules vertes. Les particules de SDC contiennent 50 p. 100 de lipides en plus des premiers enzymes de la chaîne des oxydations cellulaires qui sont, dans l'ordre : les deshydrogénases flaviniques de l'acide succinique et du DPNH et les cytochromes b, cl et c. Les particules vertes contiennent le cytochrome a ou cytochrome oxydase. Ce cytochrome a ne peut exyder le cytochrome c si ce cytochrome c est pur, mais l'oxyde s'il est associé aux lipides.

#### B - LA MITOCHONDRIE DU FOIE DE RAT -

Les mitochondries du foie de Rat présentent des particularités que nous allons étudier en détail, tant du point de vue de leur ultrastructure que de leur situation dans la cellule hépatique. Nous verrons aussi que de nombreux auteurs ont apparenté aux mitochondries quelques organites présents dans la cellule hépatique.

#### 1 - ULTRASTRUCTURE

L'ultrastructure des mitochondries de la cellule hépatique du Mat a été étudiée par plusieurs auteurs. PALADE (1952-1953-1956) (58-59-60) et FAWCETT (1955) (27) ont décrit les <u>crêtes</u> sous la forme de <u>microvillosités</u> ou de tubules, alors que dans beaucoup d'autres types cellulaires elles forment des plateaux cloisonnant plus ou moins la mitochondrie.

Rouiller en 1957 (09) décrit les deux formes de crêtes :

- plateaux perpendiculaires au grand axe mitochondrial
- microvillosités s'avançant dans la chambre interne.

La matrice des mitochondries hépatiques est particulièrement dense. C'est ce qui est apparu aux différents auteurs : PALADE (1952) (57), TUJIMURA (1958) (81), HEINE et coll. (1957) (35). MOUILLER (1957) (69) a signalé que la structure de la matrice n'est pas visible au microscope électronique.

Tous ces auteurs, ainsi que ÆISo (1955) (86) ont observé que les granules denses sont particulièrement nombreux dans la mitochondrie hépatique.

## 2 - LA MITOCHONDRIE DANS LA CELLUL HEPATIQUE DU RAT

Les mitochondries hépatiques ont une <u>forme</u> légèrement ovale (HOWATSON et HAM - 1957) (37). Selon ROUILLER (1957) (59) elles sont polymorphes : elles ont la forme de bâtonnets ou de Y, mais peuvent être ovalaires ou sphériques. Ce polymorphisme dépendrait de la direction du plan de coupe. Cette observation est confirmée par HEINE et coll. (1957) (35).

Leur taille est en moyenne de 0,49 selon DE MAN (1960) (19). Une cellule de foie de Rat contient environ 2.500 mitochondries. ALLARD et coll. (1952) (1) les ont dénombrées de la manière suivante : les mitochondries obtenues par centrifugation différentielle sont diluées de façon à obtenir un pourcentage connu de la concentration initiale dans le tissu et comptées dans le compteur de bactéries de PETROFF-HAUSSER. Pour le foie normal, le résultat moyen obtenu est de 35 x1010 mitochondries par gramme de tissu frais, ce qui correspond au nombre de 2.500 mitochondries par cellule (sachant qu'un gramme de foie contient 1,5 x106 cellules). Nous remarquerons toutefois que ce résultat est discutable, car le fractionnement cellulaire ne libère pas est quantitativement les différentes fractions.

0 . 0 0 0

Les mitochondries sont régulièrement réparties dans la cellule. Le microscope électronique a confirmé qu'elles pouvaient se multiplier par division (FAWCETT - 1955) (27).

JEZEQUEL (1962) (39) signale dans certains cas l'accolement d'une ou deux mitochondries à une gouttelette lipidique. Dans cescas, la membrane mitochondriale s'estompe légèrement. Ce serait une manifestation morphologique du rôle des mitochondries dans la synthèse lipidique (PALADE -1959) (61).

Les mitochondries semblent avoir un rôle dans la formation de l'ergastoplasme. Dans le foie adulte normal, il n'y a pas de relation topographique
particulière entre ces deux éléments cellulaires. Mais FAWCETF (1955) (27),
BERNHARD et ROUILLER (1956) (8) observent dans des cas de régénération hépatique
(réalimentation après le jeûne - régénération qui suit une hépatectomie ou
une intoxication par le tétrachlorure de carbone) des ilots de mitochondries
entourés de lamelles ergastoplasmiques. Ces ilots sont situés à proximité de la
membrane cellulaire ou de la membrane nucléaire. Il est probable que le rôle
des mitochondries dans cette régénération de l'ergastoplasme vient de leur
richesse en enzymes.

Toutefois les mitochondries ne sont pas les seuls éléments cellulaires impliqués dans la formation de l'ergastoplasme. Un tel rôle a également été attribué à la membrane nucléaire dont on observe parfois des sortes de bourgeons semblant se transformer en ergastoplasme, tandis qu'à ce niveau des lamelles ergastoplasmiques sont disposées en couches concentriques autour du noyau.

## 3 - ORGANITES CELLULAIRES SE RAFTACHANT AUX MITOCHOLDRIS

La cellule hépatique possède, à côté des mitochondries à structure classique, d'autres organites qui se rattachent à la mitochondrie. Ces organites, récemment identifiés, sont :

- les microbodies
- et les lysosomes.

## a) Les microbodies

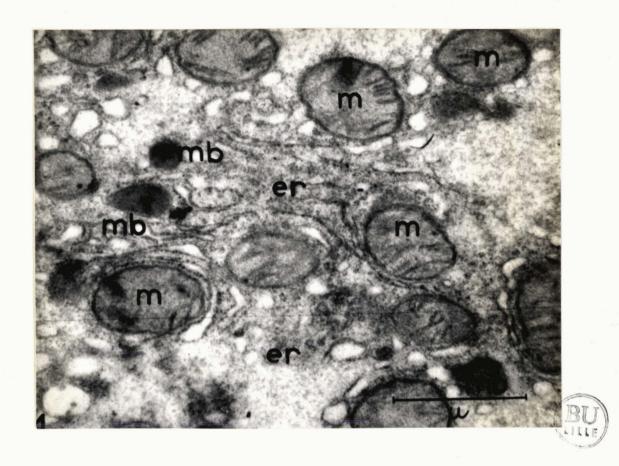
En 1954, RHODIN (67) décrit dans les cellules à bordure en brosse du rein de la souris des petits corpuscules qu'il a appelé "microbodies".

ROUILLER et BERNHARD (1956) (71) ont eux aussi décrit dans la cellule hépatique des organites qui ressemblent aux microbodies de RIODIN (figure-11).

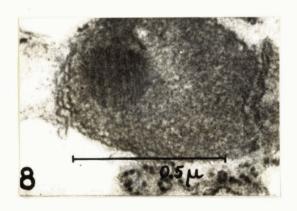
Ces organites sont ovoïdes. Leur diamètre (0,1 à 0,5 µ) est inférieur à celui des mitochondries. Leur membrane est simple et dessine très nettement leur contour. L'intérieur de ces microbodies est occupé par un corpuscule central opaque où l'on remarque une fine striation constituée par un système de doubles membranes parallèles (figure 12).

La signification de ces organites a été prouvée par l'étude du foie en régénération après une hépatectomie ou après une intoxication par le tétrachlorure de carbone (ROUILLER et BERNHARD) (71 (figure 13). Dans ces conditions physiologiques particulières, les microbodies sont beaucoup plus nombreuses qu'à l'ordinaire et situés au voisinage des mitochondries. Les coupes montrent, à côté de ces microbodies, d'autres organites dans lesquels se dessinent des crêtes internes. Il semble donc que les microbodies soient capables de se transformer en mitochondries. Mais ce fait n'est pas admis par tous les auteurs et, en tous cas, ce ne serait pas le seul mode possible de formation de nouvelles mitochondries comme le signale ANDRE (1962) (91) qui, lui, constate un rôle important du reticulum endoplasmique et des grains de PALADE dans la multiplication mitochondriale au cours de la spermatogénèse chez le Rat.

Ce rapprochement effectué par les biologistes entre microbodies et mitochondries a été confirmée par des études biochimiques. En 1960, DE DUVE et coll. (17), après avoir obtenu les mitochondries de foie par les procédés de fractionnement cellulaire classiques, les soumettent à une nouvelle centrifugation dans un gradient de glycogène allant de 0 à 0,23 g de glycogène par ml de saccharose aqueux 0,5 M. La fraction la plus légère s'est révélée



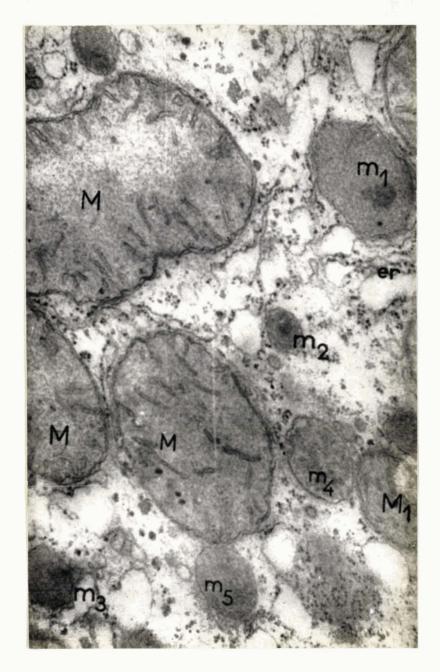
Cellule hépatique de Rat normal. On y observe des mitochondries (m) et des petits corpuscules ou "microbodies" (mb) qui voisinent avec l'ergastoplasme (er) - (d'après ROUILLER et BERNHARD) (71) (x 30.000)



#### FIGURE 12

détail d'un "microbody". L'accollement de l'ergatoplasme donne une impression de double membrane.

Le corps central possède une structure en lamelles doubles. (d'après ROUILLER et BEMNHARD) (71) (x 72.000)





Cellule hépatique de Rat 18 heures après hépatectomie partielle (d'après RUUILLER) (69)

M = mitochondrie

Ml = jeune mitochondrie probable (on ne voit la double menbrane que sur une partie du pourtour seulement)

ml, m2, m3 = microbidies

m4, m5 = transition entre microbodie et mitochondrie

(x 55.000)

- 22 -

particulièrement riche en uricase, ainsi qu'en catalase et en d-aminoacide deshydrogénase.

NOVIKOFF examine en 1961 (53) ces particules au microscope électronique et constate qu'elles sont analogues aux microbodies déja observés en place dans la cellule.

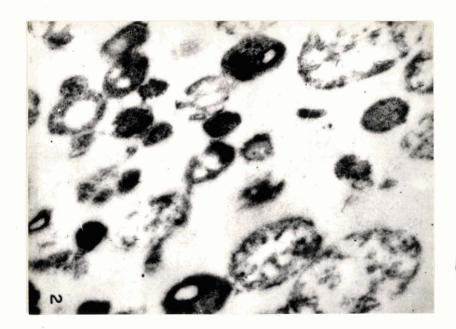
Ainsi les microbodies peuvent se rattacher aux mitochondries par suite de l'existence de formes de transition entre ces deux types d'organites, par le fait qu'ils sont isolés dans la fraction mitochondriale et qu'ils contiennent des enzymes. Ils s'en distinguent toutefois par leur structure et par leur teneur plus élevée en certains enzymes.

### b) Les lysosomes

Les connaissances acquises sur les <u>lysosomes</u> sont, comme pour les microbodies, le résultat de travaux morphologiques et biochimiques. Mais le terme de lysosome a été attribué ici à une sous-fraction des mitochondries avant que ne soient décelés dans la cellule les corpuscules correspondant à cette fraction.

En 1953, DE DUVE et coll. (18) ont mis en évidence dans les mitochondries de foie de Rat obtenues par centrifugation différentielle une fraction particulièrement riche en phosphatase acide, en ribonucléase, en désoxyribonucléase, en cathepsine et en  $\beta$ -glycuronidase. Cette fraction, composée de mitochondries légères, se sépare des granules riches en cytochrome oxydase par un simple lavage ou par la méthode des gradients de densité. Les particules ainsi isolées ont été appelées <u>lysosomes</u>.

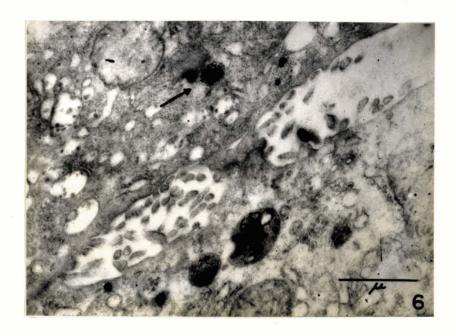
paration mitochondriale possédant une "activité phosphatase acide" et l'ont étudiée au microscope électronique. Dans leurs préparations apparaissent en assez grand nombre des "corpuscules denses" qui ont en moyenne 0,37  $\mu$  de diamètre et n'existent pratiquement pas dans les fractions pauvres en phosphatase acide (figure 14). L'intérieur des corpuscules denses est occupé par des





Isolement, à partir d'un homogénat de foie de Rat normal, d'une fraction riche en phosphatase acide. On observe dans cette fraction de nombreux corpuscules denses possédant souvent des granulations internes. (d'après MOVIKOFF et coll.) (54)

(x 50.000)



## FIGURE 15

Des corpuscules denses s'observent dans la cellule hépatique à proximité des canalicules biliaires (d'après ROUILLER in NOVIKOFF) (54)

(x 24.000)

granules à grande densité électronique de 56 à 76 Å, donc plus petits, que les grains de PALADE qui mesurent environ 170 Å. Certains corpuscules montrent des cavités internes entourées par un matériel dense. La membrane des corpuscules ne peut être observée que dans certains cas favorables mais il y a tout lieu de croire qu'elle est toujours présente (figure 14).

MOVIROFF et coll. ont alors remarqué que les corpuscules qu'ils observaient dans leurs préparations étaient identiques aux corpuscules denses décrits par ROUILLER (1954) (68) sur des coupes de foie à proximité des canalicules biliaires (figure 15).

hais, plus récement encore, en 1961 (36) HOLT et HICKS, appliquant à la microscopie électronique la technique de GOMORI pour la mise en évidence de la phosphatase acide ont constaté qu'une partie seulement des corpuscules denses prenaient la coloration. Seuls ces corpuscules correspondraient aux lysosomes définis par les biochimistes.

# C - LA NITOCHONDRIE DU FOIE NORMAL DANS DES ETATS PHYSIOLOGIQUES PARTICULIERS -

La structure mitochondriale qui vient d'être décrite concernait le foie des Rats normaux adultes dans les conditions physiologiques habituelles les plus favorables. Certains auteurs ont étudié en outre l'effet de l'hépatectomie partielle sur les mitochondries du foie. L'intérêt porté à ce cas particulier vient du fait qu'après ablation d'une de ses parties, le foie régénère et qu'il était intéressant de comparer la multiplication cellulaire de cet organe normal avec celle qui se produit dans les tissus tumoraux.

En ce qui concerne les mitochondries deux stades doivent être envisagés :

- leur état dans le foie du Rat qui vient d'être hépatectomisé
- leur état dans le foie qui régénère après hépatectonie.

#### 1 - MITOCHONDRIES DU FOIE D'UN RAT REPATECTOMISE

Un foie pout subir l'ablation de la montié environ de son volume. Selon GANSLER et ROUTLLER (1957) (29) et ROUTLLER (1957) (69) les mitochondries de foie de Rat hépatectomisé se tuméfient, confluent en grandes vacuoles.

### 2 - MITOCHOADRIES DANS LE FOLE QUI REGENERE APRES REPATECTOALE

ALLARD et Coll. (1952) (2) constatent que pendant la régénération qui suit une hépatectomie partielle, le nombre des mitochondries diminue. Cette diminution persiste pendant 8 jours environ; le nombre de mitochondries s'élève ensuite lentement et redevient normal au 12ême jour. Ces auteurs comparent cette diminution du nombre des mitochondries à celle qu'on observe au cours des premiers stades de la cancérisation par les colorants azoïques.

. . . . . .

ROUILLER (68) observe en outre une <u>augmentation</u> du nombre et de la <u>taille</u> des microbodies présents dans la cellule (figure 13). Il observe des formes de passage entre microbodies et mitochondries. Leur membrane externe semble moins nette. Dans la matrice apparaissent des structures rappelant les crêtes internes.

Enfin, ROUILLER observe une régénération à partir des mitochondries tuméfiées dont le contenu augmente et qui deviennent plus denses.

3 - A côté de cette étude des mitochondries de foies de Rats hépatectomisés, il serait intéressant d'observer les mitochondries de foies de Rats au <u>stade</u> <u>embryonnaire</u> où les cellules se divisent activement. HOWATSON et HAM (1955) (37) qui ont observé de telles mitochondries signalent qu'il y ont vu des crêtes plus grandes que dans les mitochondries de foie de Rat adulte.

Pour résumer cette rapide revue concernant les mitochondries du foie de Rat normal, nous pouvons dire que, dans le cas général des rats adultes, les mitochondries du foie présentent un certain nombre de caractéristiques: leur taille varie de l à 1,5 , elles sont ovales ou sphériques, leur matrice est dense et leurs crêtes sont courtes. hais, dans d'autres cas où le foie peut être considéré comme normal, ce schéma général subit des variation : augmentation de leur taille, éclaircissement de la substance interne, agrandissement des crêtes.

Nous allons maintenant rechercher quelles modifications ont été observées dans les mitochondries de foies pathologiques.

#### IV - LA MITOCHONDRIE A L'ETAT

#### PATHOLOGIQUE

Les principales lésions hépatiques étudiées jusqu'à présent au microscope électronique peuvent se répartir en trois groupes selon leur origine.

### a) Les l'sions d'orisine toxique.

Elles sont provoquées principalement par :

- les colorants azoïques, en particulier le paradiméthylaminoazobenzène (p-DAB; ou jaune de beurre) et ses dérivés.
- le tétraclorure de carbone (C.Cl4).
- le phosphore.

## b) Les Lésions d'origine carentielle.

Elles apparaissent après un jeûne prolongé ou après l'administration d'un régime alimentaire carencé.

## c) Les lésions d'origine cancéreuse.

Les cancers du foie ou hépatomes sont provoqués par l'administration répétée de substances toxiques. Les tumeurs induites par le paradimethylamino-azobenzène ou par ses dérivés, ont été étudiées au microscope électronique, soit sour leur forme habituelle, solide, soit sous une forme ascitique.

Nous allons rechercher quelles transformations mitochondriales ont été observées dans tous les cas que nous venons d'énumérer. Notons que plusieurs auteurs rapportent conjointement à leurs examens au microscope électronique des observations au microscope optique, mais le faible pouvoir de résolution de cet instrument ne leur pas permis de faire sur les mitochondries des observations intéressantes.

## A. - L'HEPATITE TOXIQUE.

## I - INTOXICATION PAR LES COLORANTS AZOIQUES.

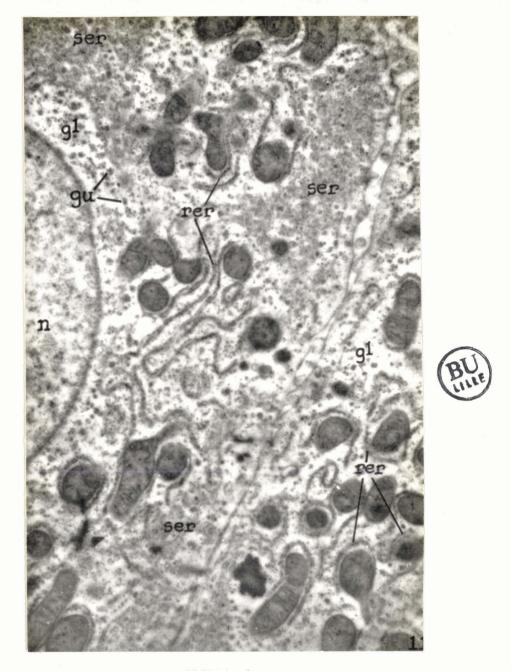
En 1957, HEINE et coll. (25) étudient au microscope Aectronique les cellules de foie de rats nourris avec du 3'-méthyl-4-dim éthylaminoazobenzène (3'-Me-4-DAB) pendant trois mois. Ces cellules montrent d'importantes transformations. Il reste quelques mitochondries normales. Les autres possèdent des crêtes altérées et ont une taille variable. A côté de ces deux catésories mitochondriales, existent enfin des petits corpuscules denses en partie remplis de granules osniophiles, en partie optiquement vides au microscopique électronique. Ces corpuscules sont abondants dans la cellule et sont entourés de lamelles doubles présentes dans le hyaloplasme.

TUJIMURA (1958) (82) administre à des rats un régime renfermant 0,06 g. de paradiméthylaminoazobenzène (p-DAB) p. 100 grs. d'aliments. Au cours des 60 premiers jours de régime, l'auteur observe des modifications dégénératives affectant, entre autres, les mitochondries. Celles-ci se gonflent et premnent un aspect vacuolaire.

PORTER et BRUNI (1959) (64) étudient enfin les effets du cancérigène 3'-Me-4-DAB sur le foie des rats au cours des tout premiers jours de régime. Pendant 24 à 48 heures, il y a peu de différence avec les mitochondries des animaux de contrôle. Les mitochondries sont sphériques, elles ont 1 µ de diamètre. A côté d'elles on observe des lysomes et des "microbodies". (Fig. 16)

Par contre, dans les cellules hépatiques d'animaux nourris avec du 3'-Me-4-DAB pendant 2 à 7 jours, les mitochondries sont le plus souvent allongées au lieu d'être sphériques. Certaines formes contiennent, dans la matrice mitochondriale, des petites vésicules. Le nombre de ces formes est plus élevé au bout de 11 à 15 jours de régime que dans les premiers jours.

# II - INTOXICATION PAR LE TETRACHLORURE DE CARBONE.



Cellule h'patique d'un Rat recevant le colorant azoïque 3'-Me-4-DAB depuis 40 h. Un observe autent de mitochondries circulaires que de mitochondries allongées.

Le reticulum endoplasmique se présente sous forme agranulaire (ser) ou sous forme granulaire (c'est l'ergastoplasme avec ses ribosomes : rer).

```
n = noyau
gl = plages de glycogène
gu = petites unités de glycogène dans ces plages
(d'après PORTER et BRUNI) (64)
(x 19.000)
```

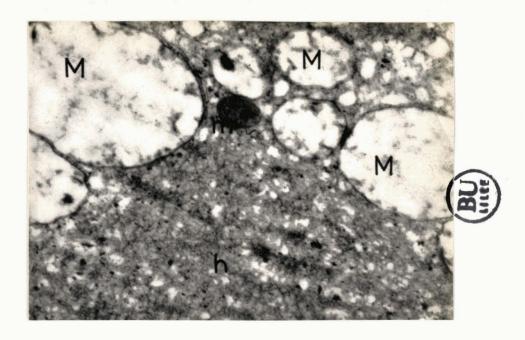
DIANZANI et BAHR (1954) (20) isolent les mitochondries de foies de rats sacrifiés après avoir reçu du tétrachlorure de carbone et les étalent sur des membranes de formver pour examen au microscope électronique. Ces mitochondries ont des formes plus variées que celles du foie normal. Elles prennent des formes de bâtonnets, de fuseaux, des formes intermédiaires entre sphères et bâtonnets. La taille surtout est très différente : le diamètre moyen de ces mitochondries est en effet de 0,92 ¼ (au lieu de 0,87 ¼). Il faut surtout noter le grand nombre de mitochondries très petites et très grandes (jusque 3,5 ¼ de diamètre).

OBERLING et ROUILLER (1956) (57) ont étudié les effets de l'intoxication aigüe par le tétrachlorure de carbone sur des coupes de foie de rat. Le tétrachlorure de carbone provoque une nécrose des cellules situées au centre des lobules hépatiques. Si l'administration de ce poison est unique, une régénération est possible à partir des cellules de la périphérie du lobule.

60 minutes après l'administration de tétrachlorure de carbone, les mitochondries de certaines cellules commencent à <u>se gonfler</u>. Au bout de 2 heures, les mitochondries gonflées sont plus nombreuses encore : leurs crêtes sont rares ou absentes, la matrice est constituée de quelques dépôts floconneux (Fig. 17). Il reste dans certaines cellules des mitochondries normales. Dans d'autres cellules où l'ergastoplasme se vésiculise, les mitochondries ont plutôt tendance à devenir plus petites et plus denses.

Dans la région centrolobulaire, les mitochondries sont ensuite phagocytées comme tous les autres éléments cellulaires. Dans les cellules périphériques très altérées, certaines mitochondries se rompent et <u>confluent en</u> grandes vésicules. (FiG 18)

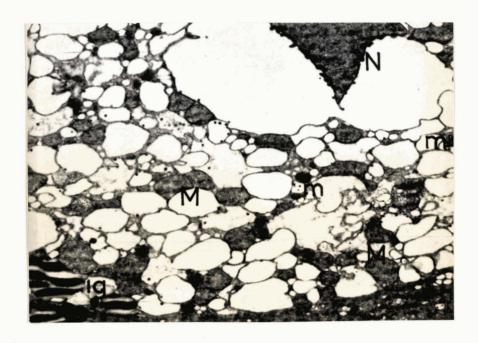
Toutefois, certaines cellules périphériques résistent à l'intoxication. Après le 3e jour qui suit l'administration du toxique, on observe une régénation mitochondriale. Dans les mitochondries encore gonflées, les crêtes augmentent de taille. De très fins filaments se concentrent dans le corps mitochondrial, se disposent linéairement et donnent de nouvelles crêtes. Le gonflement est donc réversible.



### FICURE 17

Cellule hépatique d'un Rat sacrifié 2 h après intoxication par le tétrachlorure de carbone.

H = mitochondries (les mitochondries sont gonflées)
m = "microbodies"
(d'après OLERLING et ROUILLER) (57)
(x 25.000)



### FIGURE 18

Cellule hépatique d'un Rat sacrifié 12 h après intoxication par le tétrachlorure de carbone. Stade de la cellule en ballon. Mitochondries et microbodies persistent entre les vacuoles cytoplasmiques.

(d'après OBERLING et ROUILLER) (57) x 7.000

### III - INTOXICATION PAR LE PHOSPHORE.

DIANZANI et BAHR (20) isolent les mitochondries du foie de rats qui ont reçu des injections intrapéritonéales de phosphore, et, comme les mitochondries ayant subi l'action du tétrachlorure de carbone, ils les étalent sur des membranes de formvar pour examen au microscope électronique. Toutes les mitochondries sont sphériques et les formes géantes sont très nombreuses. Le diamètre moyen est de 1,23 p avec des formes atteignant 4,10 pl. Une analyse chimique révèle une augmentation de 70 p. 100 du taux des lipides.

Une étude cytologique a été réalisée par JEZEQUEL (1958) (38). 18 heures environ après une injection intrapéritonéale de phosphore blanc, les mitochondries augmentent de taille et s'arrondissent. Leur ultrastructure n'est guère modifiée et les crêtes sont toujours visibles (Fig. 19). Toutefois au bout de 4 jours, si l'animal est dans un état grave, les mitochondries dégénèrent : la matrice devient granuleuse, les crêtes disparaissent, la membrane devient unique et peut se rompre. Aucune inclusion assimilable à des lipides n'a été observée à l'intérieur des mitochondries.

Habituellement le foie régénère. Les mitochondries qui ici ont peu souffert de l'administration de la substance toxique (contrairement à ce qui se passe dans le cas de l'intoxication par le tétrachlorure de carbone) reprennent leur aspect normal. Des microbodies se transforment également en mitochondries

## B. - L'HEPATITE CARENTIELLE.

### I - INFLUENCE DU JEUNE

Selon ALLARD et coll. (1952) (1) qui ont compté les mitochandries isolées par centrifugation différentielle, le nombre des mitochondries augmente dans la cellule hépatique après 6 jours de jeûne.

ROUILLER et GANSLER (1955) (72), et ROUILLER (1957) (69) observent que le jeune prolongé provoque un gonflement des mitochondries. Les mitochondries sont agrandies, leur matrice est claire et les crêtes sont rejetées à la périphérie.

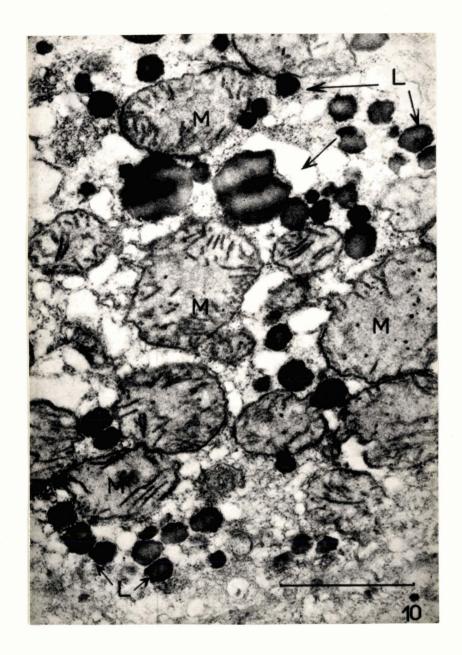


FIGURE 19

Cellule hépatique d'un Rat 4 jours après injection de phosphore Maximum de troubles cytoplas iques. Les mitochondries ont relativement peu souffert. Elles sont gonflées.

```
M = mitochondries
L = lipides
(d'après JEZEQUEL) (38)
(x 36.000)
```

. . . . .

TUJIMURA (1958) (81) constate contrairement à ALLARD et coll. (1) une diminution du nombre des mitonchondries. Ces mitochondries se vacuolisent et leur matrice s'éclaircit.

Quand l'animal est réalimenté après le jeûne, ses cellules reprennent un aspect normal. Selon ROUILLER (1957) (69) certaines mitochondries tuméfiées se densifient en augmentant leur substance interme.

FAWCETT(1955) (27) observe également une densification de la matrice mitochondriale. Le gonfle ent des mitochondries dû au jeûne est donc réversible.

#### II - INFLUENCE D'UN REGIME DEFICIENT.

DEMAN (1960) (19) administre à des rats le régime suivant : riz à volonté, carottes une fois par semaine pour éviter une carence en vitamine A. Ce régime est pauvre en vitamines et en protides. Dans le foie des rats ainsi alimentés, les mitochondries <u>diminuent de taille</u> (0,28 \mu au lieu de 0,49 \mu). Ce phénomène est réversible. En effet, si des animaux nourris avec du riz pendant 3 mois, sont ensuite soumis à un régime normal, les mitochondries reprennent approximativement leur taille (0,45 \mu). Un régime déficient fait à nouveau diminuer la taille des mitochondries.

## C - L'HEPATOME

## I - L'HEPATOME SOLIDE.

En 1955, HOWATSON et HAM (37) publient la première étude complète au microscope électronique de tumeurs de foie de rat.

Il s'agit de deux tumeurs :

- l'hépatome de NOVIKOFF, induit à l'origine chez le rat par le 4-diméthylaminoazobenzène, transplanté ensuite par greffes dans la cavité abdominale : la tumeur est broyée puis injectée à d'autres animaux en injection sous-cutanée ou intrapéritonéale (NOVIKOFF 1957) (51). Cet hépatome est dû à la prolifération des hépatocytes. ....

- le carcinome LT 128 du foie de rat. Il a la même origine que l'hépatome de NOVIKOFF, une cancérisation hépatique induite par un régime au 4-diméthyla-minoazobenzène. Mais ici, la tumeur a été transplantée par passages dans la membrane vitelline d'embryons de poulet. Les cellules néoplasiques proviendraient ici des cellules biliaires plutôt que des hépatocytes.

Dans les cellules de l'hépatome de NOVIKOFF, les principales modifications intéressent l'ergastoplasme qui disparait en partie, et les mitochondries. Celles-ci sont beaucoup moins nombreuses que dans la cellule normale : 600 par cellule. Ce résultat est très proche de celui que ALLARD et coll. ont obtenu par la méthode de comptage de mitochondries isolées (700 mitochondries par cellule).

La taille des mitochondries est comprise entre 0,24 p et 1,2 p, alors que dans le foie normal elle est de 0,35 à 0,74 p. Il existe en outre dans l'hépatome des <u>formes de désérérescence</u> mitochondriale qui peuvent atteindre 1,9.

Les mitochondries non dégénérées ne sont pas allongées comme dans le foie normal. Elles sont sphériques ou elliptiques. Leur structure est modifiée : les <u>crêtes</u> qui étaient peu saillantes dans le foie normal, sont ici <u>très dévelop pées</u>. Elles traversent la mitochondrie et peuvent s'anastomoser d'un bord à l'autre de la membrane mitochondriale. (Fig. 20)

Les mitochondries dégénérées conservent une double membrane, mais celle-ci peut se rompre. Les crêtes ont presque disparu. L'intérieur de ces mitochondries est occupé par une substance granulaire disposée en masses irrégulières.

Dans les cellules de la tuneur LT 124, les mitochondries sont également moins nombreuses que dans le foie normal. Leur ultrastructure est cependant moins modifiée que dans l'hépatome de NOVIKOFF: il n'y a pas de grandes crêtes internes. Il n'existe pas de formes de dégénérescence mitochondriale.

D'après ces observations, la diminution du nombre des mitochondries semble être un trait caractéristique de la cellule hépatomateuse. HOWATSON et HAM ont émis l'hypothèse qu'il existait une corrélation entre ce fait et la rareté de l'ergastoplasme, par analogie avec la cellule de foie embryonnaire où l'ergastoplasme et les mitochondries sont très abondants et situés au voisinage



Cellules de l'hépatome de MOVIKOFF. Les mitochondries possèdent de grandes crêtes.

(d'après HOWATSON et HAL) (37) (x 17.000)

l'un de l'autre. Les modifications subies par les mitochondries suggèrent l'idée d'une mutation mitochondriale. Cette hypothèse semble peu probable à HOWATSON et HAM puisque des mitochondries morphologiquement différentes de celles du foie normal existent par exemple dans le foie embryonnaire.

Ces auteurs se demandent enfin si le matériel abondant présent dans les mitochondries dégénérées ne représente pas la forme de dissociation d'un virus.

Les observations faites par HOWATSON et HAM sur les mitochondries de l'hépatome de NOVIKOFF ont été confirmées par NOVIKOFF lui-même (1957) (51) qui reprend l'hypothèse de l'existence d'un virus dans les mitochondries dégénérées.

En 1955, BERNHARD et BAUER (7) étudient un hépatome induit par le diméthylaminoazobenzène (DAB). Ils observent également des modifications de l'ergastoplasme et des mitochondries qui sont très altérées.

En 1957, HEINE et coll. (35) observent dans l'hépatome induit par le 3'-méthyl-4-diméthylaminoazobenzène des modifications profondes des mitochondries. Les mitochondries normales sont très rares. Au contraire, les corpuscules denses déjà observées dans l'hépatite sont très abondants et représentent à peu près le seul élément figuré de la cellule. Leur diamètre est compris entre 0,4 et 0,5 \mu. Ils sont limités par une double membrane. La membrane interne forme des replis courts et digités. Il semble à HEINE que ces corpuscules peuvent être assimilés aux mitochondries.

La tumeur greffée présente des modifications cellulaires encore plus marqués. Les mitochondries normales ont tout-à-fait disparu. Les corpuscules denses identifiés aux mitochondries dans la tumeur primitive sont peu abondants tandis qu'ils sont très nombreux dans le cas précédent. Ces corpuscules contiennent des granulations internes osmiophiles et parfois aussi des ébauches de crêtes.

TUJIMURA (1958) (83) observe que dans l'hépatome qui survient après

90 à 150 jours de régime paradiméthylaminoazobenzène (p-DAB), les mitochondries diminuent en nombre et en taille, ce qui confirme les observations faites par ALLARD et coll. (3-4) et par HOWATSON et HAM (37).

Selon DRIESSENS, DUPONT et DEMAILLE (1959) (21), dans l'hépatome au jaune de beurre, les mitochondries sont moins nombreuses et plus petites que dans le foie normal. Les crêtes sont plus grandes que dans les mitochondries normales. Ces mitochondries sont disposées dans l'ensemble à la périphérie de la cellule. Enfin, dans la tumeur étudiée, existent des formes nombreuses de dégénérescence mitochondriale avec gonflement et réduction des crêtes. La double membrane cependant subsiste.

En 1960, DE MAN (19) étudie les variations de la taille et de la structure des mitochondries selon le régime. Des rats reçoivent un régime cancérigène contenant 10 mgrs. d'un colorant azoïque : le N-N-diméthyl-p-phényl- azoaniline. Dans la tumeur obtenue avec ce régine, les mito chondries sont moins nombreuses que dans le foie normal. Leur disposition dans la cellule est variable, . elles se groupent autour du noyau et peuvent même pénétrer dans les invaginations cytoplasmiques intranucléaires.

Certaines mitochondries ont une structure normale, d'autres sont gonflées, leurs crêtes sont réduites, d'autres, au contraire, possèdent une structure interne très d'veloppée. Il existe enfin des formes de dégénérescence où la matrice se vacuolise.

La taille des mitochondries a été mesurée dans un hépatome induit au bout de 15 mois de régime cancérigène. Elles ont, en moyenne 0,30 M de diamètre, ce qui est <u>inférieur à la taille normale</u> (0,49 M). Si l'animal est ensuite remis à un régime normal, les mitochondries ne reprennent pas leur taille normale, au contraire de ce que font les mitochondries dans le cas de l'hépatite.

Il convient de citer ici les travaux de <u>comptage de la population</u> mitochondriale effectués par ALLARD et coll. en 1952-53 (3-4). Ces auteurs ont

pu comparer la population mitochondriale du foie de rat normal et de l'hépatome induit par un régime contenant 0,06 p. 100 de 4-diméthylaminoazobenzène (4-DAB).

Le foie normal renferme en moyenne  $33 \times 10^{10}$  mitochondries par gramme de tissu frais. Dans l'hépatome, ce nombre est plus élevé :  $41 \times 10^{10}$ . Il faut en déduire que les mitochondries du foie hépatomateux sont plus petites que les mitochondries de foie normal.

D'autre part, le nombre de cellules par gramme de foie porteur de tumeur est de 92 x 10<sup>6</sup>. Le nombre de mitochondries par cellule est ainsi de 4.500 (alors qu'il était de 2.500 dans le foie normal). Les mitochondries sont donc plus nombreuses dans les cellules de foie hépatomateux que dans les cellules de foie normal.

Toutefois il convient de distinguer le foie total porteur de tumeur et la tumeur elle-même. Dans la tumeur, le nombre de cellules par gramme est de  $554 \times 10^6$  et le nombre de mitochondries par cellule est de 711, ce qui est considérablement inférieur à la valeur trouvée dans la cellule normale.

Le procédé de comptage a été décrit plus haut pour les mitochondries de foie normal.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau de la page 35 (Le nombre de cellules par gramme de tumeur :  $554 \times 10$  , a été précisé par PRICE et coll. à partir des concentrations en ADN.)

Cette diminution du nombre des mitochondries dans les cellules tumorales a été retrouvée avec d'autres cancérigènes que le 4-diméthylaminoazobenzène (4-DAB) : avec le 4'-fluoro-4-DAB et avec le 2-acetylaminofluorene (2AAF). (ALLARD et coll. 1952) (4)

## II - L'HEPATOME ASCITIQUE.

Il arrive qu'un hépatome, greffé dans la cavité péritonéale d'un rat, y évolue sous forme d'un liquide d'ascite, liquide où sont épars des cellules tumorales isolées et des éléments figurés du sang.

TABLEAU I

Nombre de mitochondries par gramme de foie	Nombre de cellules par granne de foie	Nombre de mitochondries par cellule
33 x 10 <sup>10</sup>	133 x 10 <sup>10</sup>	2.480
41,9	92	4.550
39,4	554	7 <b>1</b> 1
	par gramme de foie  33 x 10 <sup>10</sup> 41,9	par gramme de foie par gramme de foie  33 x 10 <sup>10</sup> 133 x 10 <sup>10</sup> 41,9  92

DRIESSENS, DUPONT et DEMAILLE (1959) (22), ont étudié au microscope électronique l'hépatome ascitique de ZAJDELA. Certaines mitochondries sont normales. Elles sont au nombre de 20 à 30 par cellule. Leurs crêtes sont fluctueuses et leur matrice est claire.

D'autres sont gonflées, elles atteignent 3 à 5 fois la taille normale des mitochondries et renferment un matériel granuleux amorphe. Le caractère double de leur membrane est à peine visible.

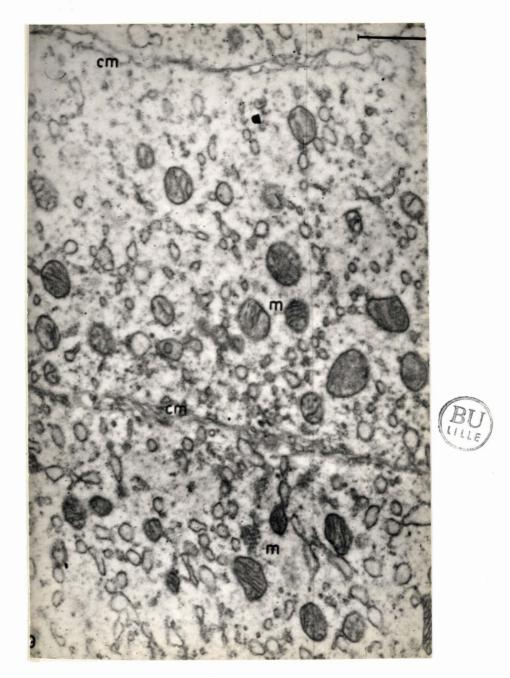
En 1961, BALRATI (5) étudie l'hépatome ascitique de YOSHIDA, sarcome hépatique adapté à la forme ascitique. Dans les cellules de cet hépatome,
les mitochondries sont moins nombreuses que dans le foie normal. Elles sont
ovales et conservent leur double membrane. Les crêtes ne sont plus des villosités mais des membranes traversant presque toujours la mitochondrie. (Fig. 21)
Les crêtes sont disposées tantôt dans le sens transversal, tantôt dans le sens
longitudinal. Elles sont parfois aussi circulaires.

Toutes les mitochondries ne sont pas normales, il existe des formes gonflées et ce processus peut être si poussé que la mitochondrie se transforme en vésicule sans structure interne.

#### CONCLUSIONS

Nous avens vu que les mitochondries du foie normal du rat adulte ont certaines caractéristiques (taille : l à 1,5 p - matrice dense - crêtes courtes) et que les mitochondries de foie normal, dans certaines conditions physiologiques, peuvent s'écarter de ce type habituel. On voit ainsi des mitochondries gonflées dans le foie d'animaux hépatectomisés et des crêtes plus grandes que normalement dans le foie embryonnaire.

La revue des travaux effectués sur le foie pathologique nous a révélé des caractères mitochondriaux encore plus variés. Le gonflement des mitochondries semble être la première réaction mitochondriale à toute agression du foie, puisqu'il apparait très vite après une intoxication par le tétrachlorure



Cellules de l'hépatome ascitique de YOSHIDA. Les mitochondries, petites et rares, possèdent de très grandes crêtes.

m= mitochondries cm= canalicules biliaires (d'après BALMATI) (5) (x 22.000) . . . . .

de carbone, le phosphore (où toutefois il n'est pas très prononcé) et les colorants azoïques, ainsi que dans le cas d'un jeune prolongé. Notons que dans ces différents cas, le gonflement est réversible.

Ce gonflement des mitochondries se retrouve dans les cellules tumorales, mais là il n'est pas la seule modification observée. Dans certains hépatomes (hépatome de NOVIKOFF - tumeur ascitique de YOSHIDA), les crêtes sont
très grandes et constituent de véritables cloisons à l'intérieur de la mitochondrie. Dans l'hépatome décrit par HEINE, par contre, les crêtes sont à peine visibles à l'intérieur d'un corps mitochondrial très osmiophile. Enfin, très souvent, les auteurs décrivent des formes de dégénérescence mitochondriale.

Quant au nombre et à la taille des mitochondries, les auteurs signalent en général qu'ils diminuent dans l'hépatome. Par contre, ALLARD et ROUILLER sont en désaccord en ce qui concerne le nombre des mitochondries dans le foie d'un rat soumis à un jeune prolongé.

Cette revue ne met pas en évidence, surtout dans le cas de l'hépatome, des caractéristiques mitochondriales précises. Au contraire, une certaine variété de modifications se présente selon la tuneur observée dans tel ou tel laboratoire. Cette variété peut, semble-t-il, s'expliquer par le fait que les phénomènes biologiques sont très complexes car entrent en jeu de très nombreux facteurs qu'il n'est pas facile de déceler. Il en résulte qu'un très grand nombre d'observations sont nécessaires avant d'aboutir à une vue générale. Or les observations faites jusqu'à présent sur le foie de rat pathologique sont assez peu nombreuses. Il nous a donc semblé opportun d'étudier à notre tour les mitochondries du foie normal et du foie pathologique.

TRAVAUX PERSONNELS

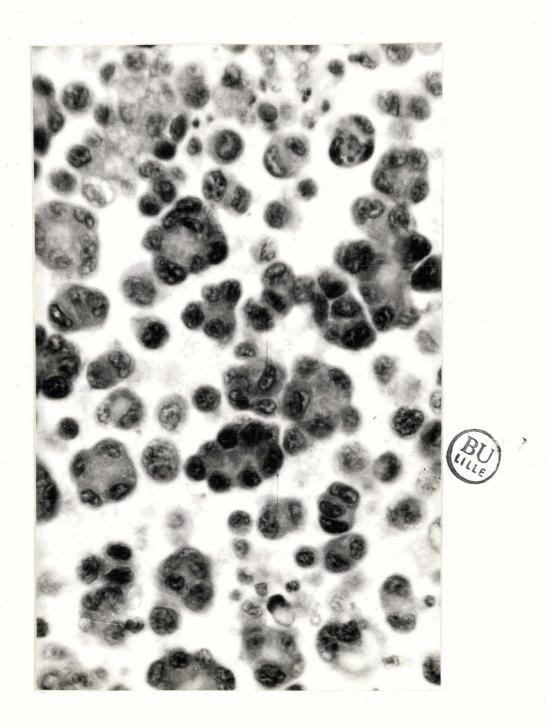
## Nos observations portent sur les foies :

- 1º De rats normaux.
- 2º De rats qui ont reçu des injections sous-cutanées de bleu trypan.
- 3º De rats recevant un régine contenant un colorant azoïque.
- 4º Sur l'hépatome solide.
- 5º Sur l'hépatome ascitique.

#### PROTOCOLE EXPERIMENTAL

#### MATERIEL

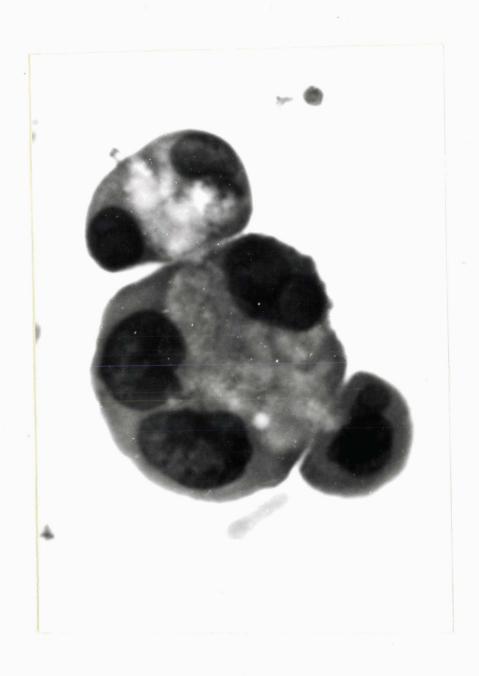
- 1º Les <u>rats normaux</u> dont nous avons étudié le foie sont des rats Wistar des deux sexes, nourris au laboratoire avec un régime équilibré.
- 2º Une <u>hépatite</u> puis une <u>cancérisation</u> du foie sont produites en administrant à de tels rats le <u>colorant azoïque</u> 3'-Me-DAB ou jaune de beurre). Le colorant est mélangé à du riz cuit. L'administration du 5'-Me-DAB s'ajoute à un régime alimentaire carencé en protides et en vitamine Bl. Les animaux soumis à ce régime sont porteurs d'un hépatome au bout de 200 jours de régime en moyenne (entre 170 et 230 jours).
- 3º Nous avons utilisé également un hépatome adapté à la <u>forme asci</u>tique: l'<u>hépatome de ZAJDELA</u>. Une telle tumeur a été créée par greffe d'un fragment d'hépatome solide dans la cavité péritonéale d'un rat. Des passages de cette tumeur sont effectués chaque semaine sur des rats Wistar. Dans l'hépatome de ZAJDELA, le liquide d'ascite comprend, outre des éléments figurés du sang, des cellules tumorales isolées ou groupées en amas de quelques cellules qui peuvent avoir une structure pseudo-acineuse. (Les éléments tumoraux sont au nombre de 20.000 à 80.000 par mm3 de liquide d'ascite) (Fig. 22 et 23).
- 4º Nous avons observé une <u>hépatite</u> chez des rats qui avaient subi des injections sous-cutanées de <u>bleu trypan</u>. Il s'agit de 5 injections de l cc. chacune d'une solution à 1 p. 100 de bleu trypan Kuhlman échelonnées de 15 jours en 15 jours.



Observation au microscope photonique de cellules d'hépatome ascitique de ZAJDELA.

Les cellules sont isolées ou groupées en pseudo-acimi. Coupe colorée à l'hémalum-éosine.

(gr = 600 environ)



Détail en microscopie photonique des cellules de l'hépatone ascitique de ZAJDELA.

Ici : groupe de trois cellules plurinucléées. Coupe colorée à l'hémalum-éosine.

(gr = 2.000 environ)

\* \* \* \* \*

Il faut noter que chez ces rats, l'hépatite n'est pas le seul phénomène observable, mais qu'il se forme une tune ur (un sarcome polymorphe) au point d'injection du bleu trypan.

### METHODES

## 1 - MICROSCOPIE OPTIQUE.

Des inclusions de <u>foie normal</u> ont été réalisées en vue d'examiner les mitochondries au microscope optique.

Les fragments de foie ont été fixés au moyen de fixateurs à base de bichromate de potassium (Cr2 07 K2) recommandés pour la mise en évidence des mitochondries.

Deux techniques ont été employées :

- a) La technique de REGAUD':

  fixation dans une solution de Cr2 07 K2 à 3% 48 h. 
  postchromisation dans une solution saturée de Cr2 07 K2 à 37º 48 h. -
- b) La technique de HELLY: fixation dans le mélange de HELLY: 24 h. postchromisation dans une solution de Cr2 07 K2 à 3 % à la température du laboratoire: 5 jours.

Les coupes réalisées à partir des fragments ainsi fixés ont pu être colorées selon la technique d'ALTMAN ou de VOLKONSKY avec de la fuchsine acide ou selon la technique de REGAU.D avec de l'hématoxyline. La coloration selon REGAU.D a donné les meilleurs résultats.

## II - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

La technique de préparation de fragments de tissus pour l'observation au microscope électronique comporte les trois mêmes étapes que pour l'observation au microscope optique : - la fixation

- la déshydratation
- l'inclusion

### a) Fixation.

Les rats sont sacrifiés par écrasement du bulbe entre deux pinces. Un fragment de leur foie est immédiate ent plongé pour fixation dans une solution d'acide osmique à 2 grs. p. 100 ml. de tampon véronal pH = 7,4. Ce fragment est découpé en petits morceaux d'un millimètre de côté. La fixation dure 1 heure.

Les fragments sont ensuite lavés pendant 5 à 10 minutes dans de l'eau distillée.

## b) Déshydratation.

La d'shydratation est progressive grâce au dispositif réalisé dans le déshydratatur de BERNHARD. L'alcool absolu tombe goutte à goutte dans le récipient rempli d'eau distillée où sont plongés les fragments de foie, ce qui augmente peu à peu le degré d'alcool dans ce récipient. Cette opération se poursuit pendant l heure 1/2. Puis les fragments séjournent encore pendant l heure dans un bain d'alcool absolu.

### c) Inclusion.

Les fragments sont inclus dans le méthacrylate de butyle. L'inclusion comporte deux bains d'une heure chacun dans le méthacrylate pur puis un troisième bain d'une heure dans le méthacrylate additionné de peroxyde de ben-

zoyle (1 gr. de peroxyde de benzoyle pour 100 ml. de méthacrylate). Le peroxyde de benzoyle catalyse la polymérisation du méthacrylate en un plastique dur à la température de 45°.

Chacun des fragments après être passé dans ces différents bains est déposé au fond d'une petite capsule de gélatine remplie de méthacrylate additionné de catalyseur. La capsule est fermée car la polymérisation s'effectue plus rapidement à l'abri de l'air puis elle est placée pendant 24 heures dans une étuve à 45°.

Pour l'inclusion de l'hépatome ascitique, après chaque étape de l'inclusion, le surnageant est éliminé par centrifugation et le culot de cellules est remis en suspension dans un nouveau bain.

## d) Coupe et observation au microscope électronique.

Les coupes sont effectuées avec un ultramicro tome Porter-Blum au moyen de couteaux de verre. Seules les coupes d'une épaisseur de 600 à 900 A ont été retenues.

Les coupes sont recueillies sur des grilles SJOSTRAND recouvertes d'une membrane de formver (500 mgrs. de formver dissous dans 100 ml. de di-chloro-1-2-éthane). Elles sont examinées aux microscopes électroniques PHILIPS EN 100 modifié avec lentilles de 25 A et ELMISKOP 1 Siemens, à des grossissements allant de 5.000 à 20.000 avec agrandissement photographique secondaire variant de 7 à 50.

RESULTATS

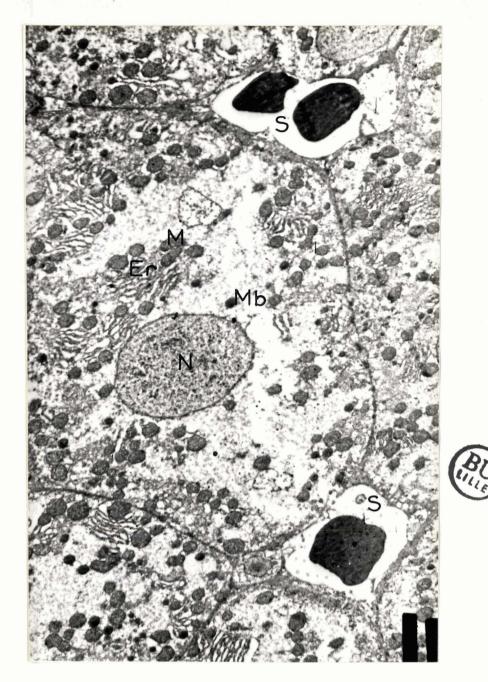
#### I - LE FOIE NORMAL

Au microscope optique, après fixation et inclusion selon REGAUD, les mitochondries nous sont apparues comme de petites granulations assez abondantes dans la cellule (Fig. 1).

L'examen au microscope électronique à un faible grossissement (x 6.000) de coupes de foie normal montre que les <u>mitochondries</u> sont nombreuses dans les hépatocytes. Nous en comptons en moyenne 80 à 100 par section de cellule. Elles se présentent comme des petites masses denses, sphériques, ovales, quelquefois très allongées et même bifurquées. Elles ont environ 0,5 à 1 plus de diamètre, mais les plus grandes peuvent atteindre 1,5 plus de long. (Fig. 24)

A un plus fort grossissement (x 20.000) (Fig. 25 et 26), nous avons pu observer l'ultrastructure des mitochondries du foie : la membrane limitante, continue, à deux feuillets ; les crêtes internes également doubles qui sont de courtes villosités issues du feuillet interne de la membrane limitante faisant saillie dans la chambre interne de la mitochondrie ; et la matrice dense, sans structure apparente, qui contient quelques granulations. Dans certains cas, nous avons pu observer des figures qui suggèrent une division mitochondriale : un pincement apparait au milieu de la mitochondrie et à ce niveau se forme une nouvelle membrane.

Nous avons observé également les "petits corpuscules" ou "microbodies" reconnaissables à leur substance interne très dense avec un corps central homogène plus dense encore. Ils sont beaucoup moins nombreux que les mitochon-



Cellule hépatique de Rat normal

N = noyau

M = mitochondries

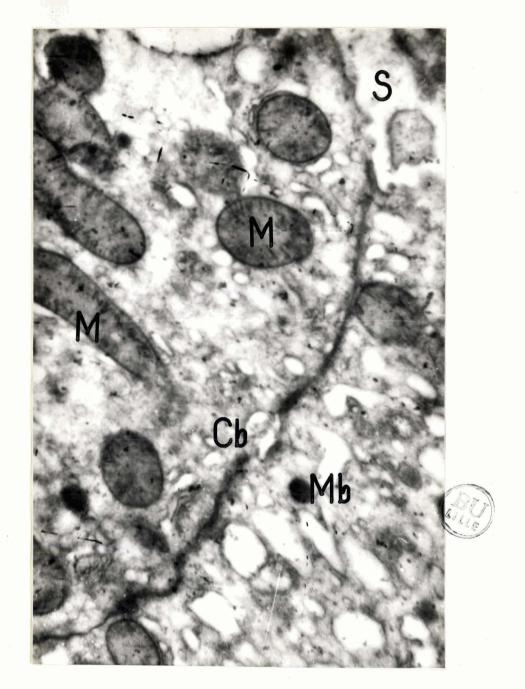
Mb = microbodies

Er = ergastoplasmo

cb = canalicule biliaire

s = sinusoïde

(Microscope électronique PHILIPS - x 2.000)



# FICURE 25

Mitochondries du foie de Rat normal, montrant une matrice dense.

M = mitochondrie

mb = microbodie

cb = canaliculo biliairo

(microscope flectronique PHILIPS - x 5.000)





Mitochondries du foie de Rat normal.

M = mitochondrie · Mb = microbodie

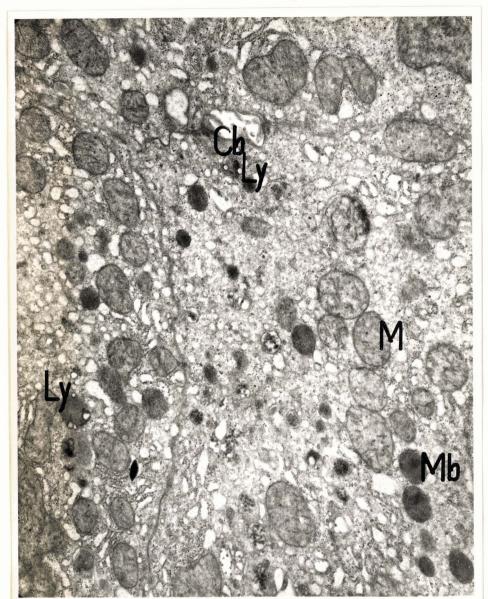
(Microscope électronique PHILIPS - x 5000)

. . . .

dries (quelques uns dans chaque section de cellule). Les plus grands atteignent la taille des plus petits mitochondries. Ils ont en moyenne 0,5 y de diamètre. Leur forme est sphérique ou légèrement ovale. Leur membrane est simple.

Nous avons enfin identifié autour des canalicules biliaires des "corpuscules denses" qui ressemblent à ceux décrits par ROUILLER et par NOVIKOFF et dont certains seulement, selon HOLT et HICKS, appartienment à la fraction biochimique des lysosomes (Fig. 27).

Nous les avons observés de préférence dans les cellules voisines des sinusoïdes, mais pas exclusivement dans ces cellules. Certains d'entre eux sont vacuolisés et possèdent 1 ou 2 vacuoles généralement excentriques. La plupart possèdent des granulations internes de taille variable.





Cellule hépatique de Rat normal montrant des corpuscules denses péricanaliculaires.

h = mitochondrie

Mb = microbodie

cb = canalicule biliaire

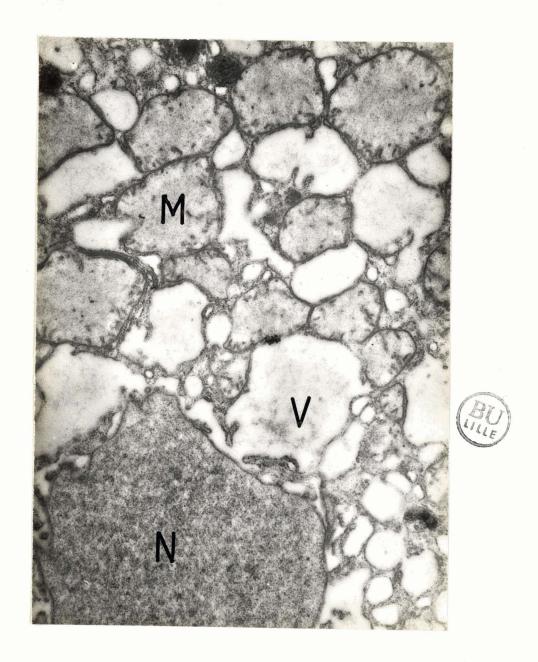
ly = corpuscule dense péricanaliculaire (lysome)

(Elmiskop I SIEMERS - x15.000)

### II - HEPATITE AU TRYPAN BLEU

Dans les cellules de foies de rats qui ont reçu des injections de bleu trypan, les mitochondries présentent au bout de deux semaines le phénomène de gonflement : leur volume augmente, leurs crêtes diminuent en nombre et en taille (Fig. 28).

Ce gonflement régresse si l'agression par le bleu trypan n'est pas trop intense et n'est pas répétée.



Mitochondries dans une cellule hépatique de Rat ayant reçu des injections de bleu trypan.

Les mitochondries (M) ont perdu une partie de leur substance interne tandis que le cytoplasme se vacuolise

M = mitochondrie

V = vacuole cytoplasmique

(Elmiskop I SIEMENS - x 18.000)

## III - HEPATITE PROVOQUEE PAR LE COLORANT AZOIQUE

L'administration du colorant azoïque 3'-Méthyl-diméthylaminoazobenzène (3'-Me-DAB) provoque dans les premières senaines de régime une hépatite toxique qui se traduit au microscope optique par un éclaircissement des cellules dû à une vacuolisation du cytoplasme. Cet état du foie a reçu le nom d'hépatite clarifiante.

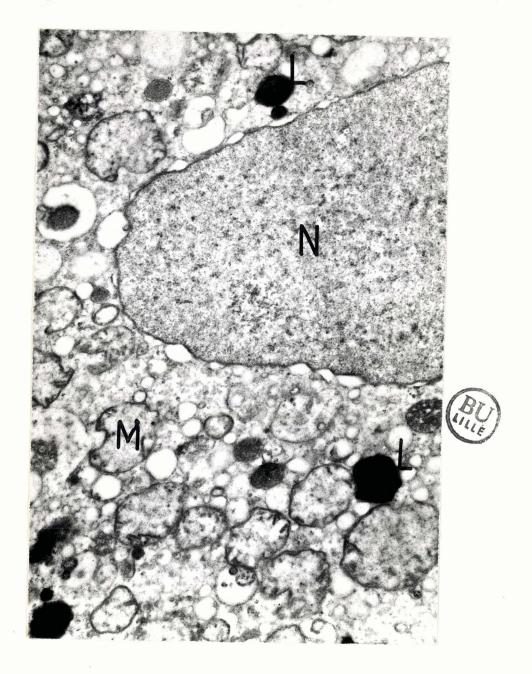
Nous avons suivi de semaine en semaine, au microscope électronique, l'effet de l'intoxication par le 3'-Me-DAB sur les mitochondries. Deux cas peuvent se présenter.

a) Dans la plupart des cellules, pendant les deux premières semaines, les mitochondries restent normales. Elles conservent leur taille et leur structure habituelles.

Dès la 3e semaine, des modifications apparaissent. Les mitochondries augmentent légèrement de taille. Leurs crêtes deviennent plus rares et plus courtes. Le gonflement s'accentue encore. Les mitochondries qui avaient conservé jusque là leur substance interne, commencent à la perdre et prennent un aspect nuageux (Fig. 29).

A la fin de la 5e semaine, les mitochondries sont très modifiées. Elles ont 6 à 7 fois leur volume normal et sont complètement vides. Il arrive même que les deux feuillets de la membrane externe s'accolent.

Cette vacuolisation des mitochondries va de pair dans la cellule avec une disparition de l'ergastoplasme dès les premières semaines.



Mitochondries dans une cellule hépatique de Rat ayant reçu dans son alimentation le colorant azoïque 3'-no-DAb.

Les mitochondrics sont gonflées.

Leur substance interno est flocomeuse.

M = mitochondrie

N = noyau

L = gouttelette lipidique

(Elmiskop I SIEMENS - x 18.000)

. . . . .

b) Dans d'autres cellules, par contre, dès le début de l'intoxication, les mitochondries se contractent légèrement et deviennent un peu plus denses que normalement, tandis que l'ergastoplasme prend des proportions considérables.

Dans ces cellules ne se produit aucune évolution des mitochondries.

### IV - L'HEPATOME AZOIQUE

Dans l'hépatome au jaune de beurre que nous avons étudié, les mitochondries sont moins nombreuses que dans le foie normal (Fig. 30). Leur structure n'est plus uniforme et différents aspects peuvent se présenter dans une même cellule ou dans des cellules voisines.

Les mitochondries d'hépatome, que nous considérons comme non pathologiques, possèdent en général des <u>crêtes beaucoup plus longues</u> que celles du foie normal. Ces crêtes traversent dans certains cas toute la mitochondrie (Fig. 31).

A côté de ces mitochondries qui ont conservé, a part leurs grandes crêtes, une structure normale, en existent d'autres plus ou moins altérées.

Nous retrouvons ici des mitochondries gonflées : crêtes courtes, matrice formant des dépôts floconneux. (Fig. 32).

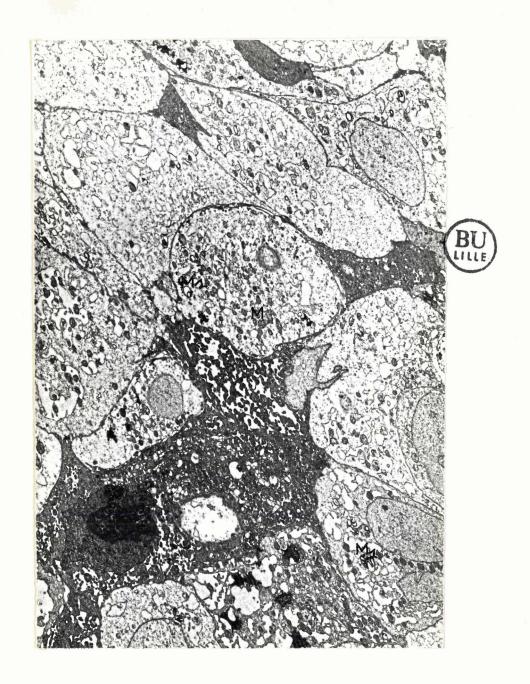
En outre, existent des mitochondries très profondément modifiées. Elles sont grandes, leur matrice a complètement disparu. Les restes de crêtes sont disposés de façon anarchique à l'intérieur du corps mitochondriale vide. Enfin, dans certaines mitochondries apparaissent des dépôts osmiophiles qui se disposent en couches concentriques et forment des "figures myéliniques" (Fig. 33).

Les mitochondries peu nombreuses, gonflées ou très altérées, sont celles que l'on rencontre dans le plus grand nombre de cellules. Dans ces cellules, l'ergastoplasme a disparu. Mais il existe d'autres cellules où l'ergastoplasme est conservé et prend même un grand développement et où les mitochondries sont nombreuses, petites et denses (Fig. 31). Parfois, en se vacuolisant, l'ergastoplasme entoure peu à peu certaines de ces mitochondries qui semblent alors englobées dans une vacuole. De telles mitochondries sont

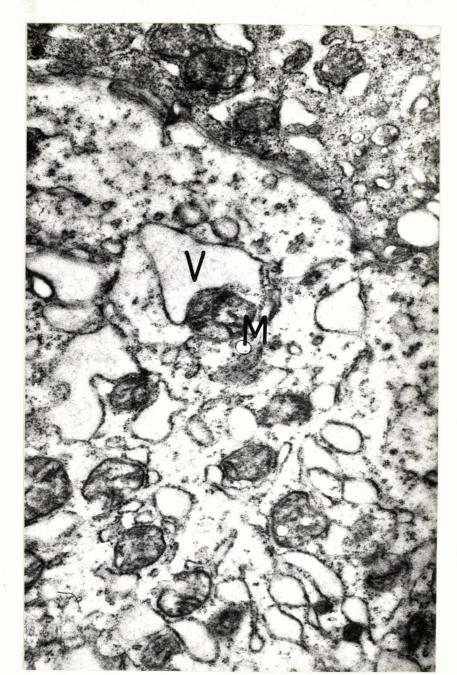
- 50 -

le plus souvent en état de dégénérescence et leur matrice a disparu.

Dans les noyaux de certaines cellules hépatomateuses, nous avons observé des mitochondries à l'intérieur d'inclusions intranucléaires particulières dues à une invagination de cette membrane nucléaire.



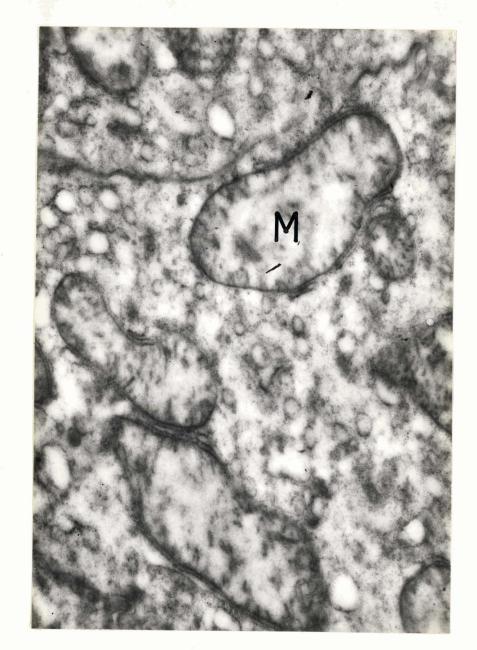
Vue d'ensemble des cellules de l'hépatome azoïque Dans de nombreuses cellules, les mitochondries sont rares. Existence de mitochondries très altérées (M1) (Elmiskop I SIEMENS - x 4.000)





Détail d'une cellule de l'hépatome azoïque. Les mitochondries (m), nombreuses dans cette cellule, ont de grandes crêtes. Ces mitochondries voisinent avec des vésicules ergastoplasmiques dilatées (V) qui ont tendance à les englober.

(Elmiskop I SILLENS - x 15.000)





Mitochondries dans l'hépatome azoïque. Les mitochondries sont gonflées (matrice floconneuse).

(Elmiskop I Slemens - x 18.000)





Dégénérescence mitochondriale dans l'hépatome azoïque.

La mitochondrie se transforme en corps myélinique (a - b - c)

Des corps myéliniques peuvent entrer en coalescence (d - e)

(Elmiskop I SIEMENS - x 18.000)

## V - L'HEPATOME ASCITIQUE

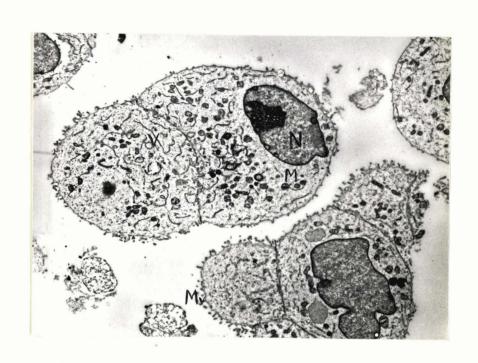
Dans l'hépatome ascitique, les modifications mitochondriales ressemblent à celles que nous avons observées dans l'hépatome solide.

Les mitochondries sont peu nombreuses dans chaque section de cellule (40 au plus).

Dans certaines cellules, des mitochondries sont petites et denses, de forme légèrement ovale. Leurs <u>crêtes</u>, visibles sur certaines coupes, sont <u>plus longues</u> que dans le foie normal. Dans certains cas, elles traversent toute la mitochondrie, dans d'autres, elles semblent converge, au centre. On observe parfois ces mitochondries au voisinage de gouttelettes lipidiques. (Fig. 34 et 35).

Dans d'autres cellules, les nitochondries sont plus ou moins modifiées. Certaines sont tuméfiées et ont perdu une grande partie de leur substance interne ainsi que la plupart de leurs crêtes. D'autres possèdent de très grandes crêtes disposées dans un corps mitochondriale vide.

Les cellules de l'hépatome ascitique sont très vacuolisées. Dans certaines d'entre elles, il ne reste presque plus de cytoplasme. On ne voit que quelques mitochondries dégénérées et quelques vésicules.



Collules de l'hépatome ascitique de ZAJDELA.

N = noyau

M = mitochondrie

V = vésicule du reticulum endoplasmique

hv = microvillosité de la membrane cellulaire.

Les mitochondries sont rares.

(Elmiskop I Slemins - x 5.000)

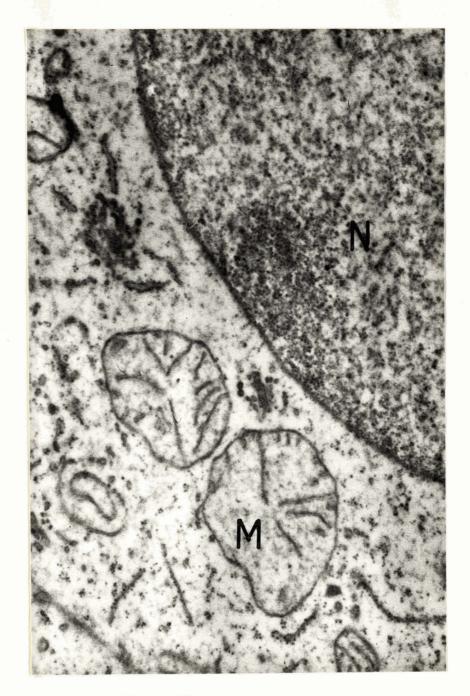


Figure 35

Cellules de l'hépatome ascitique de ZAJDELA

N = noyau

M = mitochondries

Les mitochondries possèdent de très grandes crêtes (Elmiskop I SIEMENS - x 18.000)

#### DISCUSSION - CONCLUSION

Comme nous l'avions constaté en terminant la revue de la littérature, les observations concernant le foie pathologique (hépatite et tumeur hépatique), ne sont pas très nombreuses. Il n'est donc pas possible de généraliser les faits observés. Notre travail, qui nous a permis de retrouver certaines observations antérieures plutôt que d'autres, est une étape vers une vue plus synthétique des modifications pathologiques des cellules hépatiques.

Nous nous demanderons donc quelles ressemblances ou quelles différences nous avons constatées dans le domaine des mitochondries du foie normal, de l'hépatite et du foie cancéreux, entre nos propres observations et celles qui sont mentionnées dans la littérature.

Dans les cellules de foie normal, nous avons pu observer la structure des mitochondries que décrivent à l'heure actuelle tous les auteurs. Nous n'avons pas remarqué toutefois les particularités de la membrane notées par CHANDRA.

Nous avons pu voir aussi les nicrobodies et les corpuscules denses péricanaliculaires qui contiennent, comme les mitochondries, des enzymes respiratoires.

Dans les cellules de foie subissant une hépatite clarifiante par suite d'injections de bleu trypan ou d'intoxication alimentaire par le 5'-mé-thyl-diméthylaminoazobenzène, nous avons constaté un gonflement et une tumé-faction des mitochondries qui apparaissent au bout d'un petit nombre de semaines.

Un tel gonflement est signalé dans le foie des rats ayant subi une hépatectomie partielle, dans le foie d'animaux soumis au jeune et dans les cas d'intoxication par les colorants azoiques, par le phosphore ou par le tétrachlorure de carbone. Ce phénomène semble donc une réponse habituelle de la cellule hépatique à toute agression du foie. Seul varie, de quelques heures à quelques jours, le temps au bout duquel apparait le gonflement.

Enfin dans les cellules de l'hépatome solide obtenu par une alimentation contenant du 3'-méthyl-diméthylaminoazobenzène, et dans les cellules de l'hépatome ascitique de ZAJDELA, nous avons constaté une grande variété de formes mitochondriales.

Nous avons retrouvé le gonflement des mitochondries comme dans le cas précédent.

Nous avons trouvé de très grandes crêtes comme il en est signalé dans l'hépatome de NOVIKOFF et dans l'hépatome ascitique de YOSHIDA, mais également dans le foie embryonnaire.

Nous avons de plus constaté l'existence de formes de dégénérescence avec matrice vacuolisée et crêtes anormales. Ces formes sont signalées dans la plupart des hépatomes, mais HOWATSON et HAM qui étudient deux hépatomes, n'observent de formes anormales que dans l'une des deux tumeurs. Parmi les formes de dégénérescence, nous avons pu voir la transformation de mitochondries en corps myéliniques, par accumulation de phospholipides. Ce fait n'a jamais été signalé à notre connaissance dans d'autres hépatomes.

Enfin, nous avons pu remarquer une diminution du nombre et de la taille des mitochondries, fait qui semble le plus couramment observé dans tous les hépatomes.

La description de l'ultrastructure des mitochondries dans les différents cas que nous venons d'envisager a-t-elle permis de mieux comprendre le fonctionnement de ces organites et a-t-elle apporté des faits nouveaux susceptibles d'expliquer le mécanisme de la cancérisation cellulaire?

L'observation des mitochondries de cellules normales au microscope électronique a révélé l'existence d'un système complexe de doubles membranes lipoprotéiques. La présence des crêtes internes augmente la surface des membranes en profitant au maximum du volume disponible. La découverte de cette structure, il y a quelques années, a apporté une confirmation aux chercheurs qui soupçonnaient de plus en plus une répartition spécifique des enzymes à l'intérieur des mitochondries.

Il reste encore à élucider le rôle des lipides associés emprotéines et les rapports des mitochondries avec les autres systèmes membranaires de la cellule (ergastoplasme, reticulum endoplasmique et membrane nucléaire). Des recherches de plus en plus précises au microscope électronique pourront aider à résoudre ces questions.

Ainsi l'apport du microscope électronique est important dans l'étude du fonctionnement des mitochondries de cellules normales. Par contre, la connaissance de l'ultrastructure des mitochondries de cellules cancéreuses n'a pas donné les renseignements escomptés sur le mécanisme de la cancérisation cellulaire. Si nous avons constaté des différences de forme, de nombre et de taille entre les mitochondries du foie normal et les mitochondries de l'hépatome nous avons vu que ces différences ne sont ni spécifiques ni constantes.

Cette imprécision va de pair avec celle qui concerne les modifications métaboliques des mitochondries de cellules cancéreuses. Avec MARBURG (85), on s'est demandé si des modifications respiratoires ne jouaient pas un rôle important dans la cancérisation. Mais d'autres auteurs, comme WEINHOUSE (86-87) ont pu montrer que les enzymes du cycle de KREBS étaient intacts dans les cellules cancéreuses et qu'ils fonctionnaient normalement. Les anomalies métaboliques les plus caractéristiques des cellules cancéreuses seraient une grande augmentation de la glycolyse par rapport au cycle de KREBS et un taux élevé de synthèse d'acides désoxyribonucléiques (POTTER) (65-66).

Pour parfaire ces connaissances imprécises, il est souhaitable d'associer aux recherches morphologiques des recherches biochimiques, car il semble de plus en plus évident que les lésions qui accompaenent la cancérisation sont d'ordre moléculaire.

Depuis quelques années des travaux de corrélations norphobiechiniques ent été effectués dans plusieurs donaines.

Il s'agit tout d'abord des recherches qui concernent le gonflement des mitochondries. Le rapport qui existe entre l'état de gonflement des mitochondries d'une cellule observée au microscope électronique et leur physiologie peut être illustré par le cas des cellules isolées du foie de rat normal. L'emploi, pour la dissociation du tissu hépatique, d'un milieu qui préserve la morphologie des mitochondries, tel que le sérum de boeuf additionné d'adénosine triphosphate (ATP) et d'ions manganèse Mn++, donne des cellules dont l'activité respiratoire est accrue par rapport aux cellules isolées dans un milieu traumatisant (SEGARD et colle (75). L'influence de l'ATP et du manganèse sur la contraction des mitochondries a déjà été signalée par LEHNINGER (42) et par LINDBERG (43).

D'autres travaux se rapportent au gonflement des mitochondries isolées. Ils ont été effectués par LEHNINGER et son école (42), par MARMLOT et ses collaborateurs, ainsi que par d'autres chercheurs, et ont apporté des renseignements précieux sur le mécanisme du gonflement des mitochondries : le phénomène serait dû au découplement de la chaine des oxydations cellulaires et de la phosphorylation oxydative.

En outre, ces auteurs ont montré que le vieillissement de la préparation, la thyroxine ou le diphosphopyridine nucléotide (DPN), étaient des agents de gonflement des mitochondries du foie de rat isolées dans un milieu renfermant du saccharose, et que les mitochondries du foie de rats ayant reçu dans leur alimentation un colorant azolque répondent beaucoup moins facilement que les mitochondries de foie de rats normaux aux agents de gonflement. (EMMELOT et coll.) (23) (24).

Notons que l'appréciation du gonflement mitochondrial se fait dans ces cas au spectrophotomètre (plus les mitochondries sont gonflées, moins elles absorbent les ultraviolets), mais qu'il serait très souhaitable d'effectuer des

contrôles avec un moyen d'investigation plus précis, comme le microscope électronique.

D'autres travaux essaient d'établir une corrélation entre la morphologie des mitochondries et leur activité enzymatique. L'intérêt de ces travaux réside, comme l'ont montré ROUILLER et SIMON (73), dans le fait que de nombreux enzymes sont portés par les membranes mitochondriales et qu'il est très probable que les variations de la perméabilité de ces membranes ont des répercussions sur la teneur en enzymes.

Toutefois, jusqu'à présent, la plupart de ces travaux s'adressent aux mitochondries isolées par les procédés de fractionnement cellulaire et ne comportent pas en général de contrôle électronique. Citons par exemple, ceux de CLERICI et CUDKOWICZ (1956) (14) qui démontrent qu'une alimentation contenant du diméthylaminoazobenzène augmente l'activité de l'adénosinetriphosphatase et de la cytochrome oxydase et diminue celle de la phosphatase acide. Ces auteurs constatent, en outre, qu'après un tel régime, les mitochondries isolées gonflent moins dans un milieu hypotonique que les mitochondries de foie sain et que parallèlement leur adénosine triphosphatase est moins active. Il résulte de ceci que le gonflement augmente l'activité de l'adénosinetriphosphatase.

KALTENBACH et HARMAN (1955) (40) parviennent à une conclusion analogue tandis que WITTER et coll. (1955) (89) ne constatent pas de différences dans l'activité de l'adénosine triphosphatase des mitochondries gonflées et des mitochondries normales.

Mais, depuis peu, se développent des techniques qui associent beaucoup plus étroitement le microscope électronique à la biochimie : il s'agit de la mise en évidence des enzymes mitochondriaux sur des coupes de microscopie électronique grâce à des techniques de "coloration" enpruntées à la cytologie classique. De telles techniques ont été proposées par différents auteurs pour les déshydrogénases, les phosphatases acide et alcaline, les peroxydases.

l'adénosine triphosphatase et la 5'-nucléotidase. (6, 25, 26, 36, 45, 46, 49, 50, 55, 56, 62, 74, 80).

Aucune comparaison n'a encore été établie par ce procédé entre l'équipement enzymatique des mitochondries de cellules normales et de cellules cancéreuses, mais on a tout lieu de croire que des différences existent et que le microscope électronique permettra de voir si une même différence enzymatique correspond à une même différence morphologique. Grâce à ces techniques de coloration, le microscope électronique poussera l'investigation jusqu'au niveau des gros édifices moléculaires constituant les organites cellulaires.

Notons enfin que, depuis peu, il est possible d'associer l'autoradiographie à la microscopie électronique, ce qui donne un nouveau moyen de localiser de façon tèrs précise à l'intérieur des organites les différentes substances qui les constituent grâce à l'emploi de produits radioactifs.

Ces brefs aperçus nous montrent que pour expliquer un phénomène biologique complexe comme la cancérisation d'une cellule, plusieurs disciplines peuvent très utilement associer leurs recherches. Pour sa part, le microscope électronique nous a permis de voir avec une très grande précision, dans les cellules du foie de rat normal et pathologique, la structure des mitochondries et la variété des modifications qu'elles peuvent subir.

Nous pensons que, désormais, nos recherches sur les mitochondries doivent faire appel à de nouvelles méthodes d'investigation. Des perfectionnements apportés aux techniques de fixation et d'inclusion des prélèvements tissulaires donneront sans doute, de la cellule et de ses organites, une vue différente de celle à laquelle nous ont habitués la fixation osmique et l'inclusion dans le méthacrylate de butyle. Mais, surtout, il nous semble absolument impossible de dissocier, désormais, l'étude morphologique et l'étude biochimique desmitochondries et nous comptons mettre à profit les différentes techniques qui associent la coloration de tissus ou l'autoradiographie à la microscopie électronique.

SECTION

### BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALLARD C., MATHIEU R., DE LAMIRANDE G. and CANTERO A. Mitochondrial population in mammalian cells. I. Description of a counting technic and preliminary results on rat liver in different physiological and pathological conditions. Cancer Res., 12, 407-412 (1952)
- (2) ALLARD C., DE LAMIRANDE G. and CANTERO A. mitochondrial population of mammalian cells. II. Variation in the mitochondrial population of the average rat liver cell during regeneration. Use of mitochondria as a unit of measurement. Cancer Res., 12, 580-583 (1952)
- (3) ALLARD C., DE LAMIRANDE G. and CANTERO A.- Mitochondrial population of mammalian cells. III. Mumber of mitochondria per average cell of rat liver tumor induced by 4.dimethylaminoazobenzene. Significance in the comparative study of the mitochondrial fraction properties of normal tissues and tumors. Canad. J. Res., 31, 103-108 (1953)
- (4) ALLARD C., DE LAMIRANDE G. and CANTERO A. Mitochondrial population in mammalian cells. IV. Preliminary results on the variation in the mitochondrial population of the average rat liver cell during azodyes carcinogenesis. Canad. J. Res., 30, 543-548 (1952)
- (5) BAIRATI A. Submicroscopie structure of Yoshida ascites hepatoma. Cancer Res., 21, 989-992 (1961)
- (6) BARNETT R.J. and PALADE G.E. Histochemical demonstration of the sites of activity of dehydrogenase systems with the electron microscope. J. Biophys. Biochem. Cytol., 3, 577-586 (1957)
- (7) BERNHARD W. et BAUER A. Etude d'un hépatome induit par le jaune de beurre. 294 p., Fine structure of cells, P. Noordhoff Ltd, Groningen 1955.
- (8) BERNHARD W. and ROUILLER Ch. Close topographical relationship between mito-chondria and ergastoplasm of liver cells in a definite phase of cellular activity. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, suppl., 73-78 (1956)
- (9) BOUIN F. Elements d'histologie. Volume II, 91-113, Librairie Félix Alcan Paris, 1932.
- (10) BREWNER S. Supravital staining of mitochondria with phenosafranin dyes. Biochem. Biophys. Acta, 11, 480-486 (1953)
- (11) GHANDRA S. The reversal of mitochondrial membrane. J. Cell Biol., 12, 505-513 (1962)
- (12) CHEVREMONT M. Notions de cytologie et histologie. 119-140 et 741-759, Editions Desoer Liège.
- (13) CLAUDE A. and FULLAM E.F. Electron microscope study of isolated mitochondria; methods and preliminary results. J. Exp. Med. 81, 51-62 (1945)

(14) CLERICI F.and CUDKOWICZ G. - Certain effects of p.dimethyl-aminoazobenzene, deficient diet, and hypotonic media on mitochondrial enzymes in experimental rat liver carcinogenesis. J. Nat. Canc. Inst. 16, 1459-1466 (1956)

. . . . . .

- (15) DALTON A.J. and FELIX M.D. Electron microscopy of mitochondria and the Golgi complex. Symp. Soc. Exp. Biol. 10, 148-159 (1957). Mitochondria and other cytoplasmic inclusions. Cambridge Univ. Press.
- (16) DALTON A.J., KAHLER H., KELLY M.G., LLOYD B.J. and STRIEBICH M.J. Some observations on the mitochondria of normal and neoplastic cells with the electron microscope. J. Nat. Canc. Inst. 9, 439-449 (1949).
- (17) DE DUVE C., BEAUFAY H., JACQUES P., RAHMAN-LI Y., SELLINGER O.Z., WATTIAUX R. and DE CONINCK S. Intracellular localization of catalase and of some oxidases in rat liver. Biochem. Biophys. Acta, 40, 186-187 (1960)
- (18) DE DUVE C., GIANETTO R., APPELMANS F. and WATTIAUX R. Enzymic content of the mitochondrial fraction. Nature, 172, 1143-1144 (1953)
- (19) DE MAN J.C.H. Electron microscope studies of mitochondrial structure of experimental liver tumors of rats. J. nat. Canc. Inst., 24, 795-820 (1960)
- (20) DIANZANI M.W. and BAHR G.F. Electron microscope investigation of mitochondria isolated from normal and steatotic livers by differential centrifugation. Acta path. Microbiol. Scand., 35, 25-38 (1954)
- (21) DRIESJENS J., DUPONT A. et DEMAILLE A. L'hépatome expérimental azoïque du rat examiné au microscope électronique. C.R. Soc. Biol., <u>153</u>, 788-790 (1959)
- (22) DRIESSENS J., DUPONT A. et DEMAILLE A. L'hépatome ascitique du rat blanc examiné au microscope électronique. C.R. Soc. Biol., <u>154</u>, 1557-1559 (1960)
- (23) EMMELOT P., BOS C.J. and REYERS I.H.M. Swelling of normal, preneoplastic and neoplastic liver mitochondria. I. Spontaneous and thyroxine induced swelling of normal liver mitochondria as affected by succinate and adenine nucleotides. Z. Krebsforsch., 64, 22-34 (1960)
- (24) EMBELOT P. and REYERS I.H.A. Swelling of normal, preneoplastic and neoplastic liver mitochondria. II. The swelling of liver mitochondria from mice and rats fed carcinogenic azodyes, and of hepatoma mitochondria. Z. Krebsforsch., 64, 35-51 (1960)
- (25) ESSNER E. and al. Adenosinetriphosphatase and S.nucleotidase activities in the plasma membrane of liver cells as revealed by electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 711-710 (1900)
- (26) ESSNER E. and MOVIKOFF A.B. Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysomes by meams of electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 773-765 (1961)
- (27) FAWCETT D.W. Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. J. Nat. Canc. Inst., 15 (suppl.), 1475-1503 (1955)

- (28) FREDERIC J. Arch. Biol. (Liège) 69, 167 (1958)
- (29) GANSLER H. et ROUILLER C. Modifications physiologiques et pathologiques du chondriome. Etude au microscope électronique. Schweiz. Z. allg. Path. Baktériol. 19, 217 (1956)
- (30) GLIMSTEDT G., LAGERSTEDT S. and LUDWIG K.S. The demonstration of a matrix substance in isolated rat liver mitochondria. Exp. Cell Res. 137, 575-577 (1954)
- (31) GREEN D.E. Organization in relation to enzymic function. Symp. Soc. exp. Biol. X Mitochondria and other cytoplasmic inclusions. Cambridge Univ. Press, 3049, (1957)
- (32) GREEN D.E. Biological oxidation. Sci. Amer., 56-62 (juillet 1958)
- (33) GREEN D.E. Electron transport and oxydativesphosphorylation. Advanc. Enzymol. 21, 73 (1959)
- (34) GREEN D.E. and LESTER R.L. Role of lipides in the mitochondrial electron transport system. Fed. Proc., 18, 987 (1959)
- (35) HEINE U., GRAFFI A., HELMCKE H.J. und RANDT A. Elektronen mikroskopische Untersuchungen an normalen Zellen und Tumorzellen der Ratten Leber. Z. ärztl. fortbild. 51, 648-652 (1957)
- (36) HOLT S.J. and HICKS R.M. The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol., <u>11</u>, 47-60 (1961)
- (37) HOWATSON A.F. and HAM A.W. Electron microscope study of sections of two rat liver tumors. Cancer Res., 15, 62-69 (1955)
- (38) JEZEQUEL A.M. Les effets de l'intoxication aiguë au phosphore sur le foie du rat. Etude au microscope électronique. Ann. Anat. Path., 3, 512-537 (1958)
- (39) JEZEQUEL A.A. Revue générale. Microscopie électronique du foie normal. Path. biol., 10, 501-527 (1962)
- (40) KALTENBACH J.C. and HARMAN J.W. Studies on mitochondria. VII. The relationship between the control of structure and dinitrophenol stimulation of ATP ase in liver mitochondria. Exp. cell Res., 8, 435-452 (1955)
- (41) LAZAROW A. and COUPERSTEIN S.J. J. Histochem. Cytochem. 1, 234 (1955)
- (42) LEHALNGER A.L. Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. J. Biol. Chem., 234, 2465 (1959)
- (43) LIADBERG O. and ERNSTER L. Manganese, a co-factor of oxydative phosphorylation. Nature, 173, 1038 (1954)
- (44) LOW F.N. Mitochondrial structure. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2 suppl., 337-339 (1956)

(45) MITSUI T. - Application of the electron microscope to the cytochemical peroxydase reaction in salamander leukocytis. J.B.B.C., 7, 251-258 (1960).

. . . . .

- (46) MOLBERT E.R.G., DUSPIVA F., DEIMLING O.H. von. The demonstration of alkaline phosphatase in the electron microscope. J. biophy. Biochem. Cytol., 7, 387-389 (1960)
- (47) MUHLETHALER K., MULLER A.F., ZOLLINGER H.U. Zur Morphologie der Mitochondrien. Experienta, 6, 16-17 (1950)
- (48) NOEL R. Recherches histophysiologiques sur la cellule hépatique des mammifères. Arch. Anat. Micr., 19, 1 (1923)
- (49) NOVIKOFF A.B. Histochemical and cytochemical staining methode. Analytical cytology. Mellors R.C. ed. Mc. Graw Hill, N.Y, 2nd. ed. pp. 2/1 2/3
- (50) NOVIKOFF A.B. The biochemical cytology of liver. Bull. N.Y. Acad. Med., 35, Série II, 67-70 (1959)
- (51) NOVIKOFF A.B. A transplantable rat liver tumor induced by 4 dimethylamino-azobenzene. Cancer Res., 17, 1010-1027 (1957)
- (52) NOVIKOFF A.B. Mitochondria (Chondriosomes). The cell., vol. II, p. 299. Brachet et Mirsky ed. 1961, Acad. Press. N.Y.
- (53) NOVIKOFF A.B. Lysomes and related particles. The cell, vol. II, p. 423. Brachet et Mirsky ed., 1961, Acad. Press. N.Y.
- (54) NOVIKOFF A.B., BEAUFAY H., DE DUUE C. Electron microscopy of lysome rich fractions from rat liver. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 2, (suppl.) 179-84 (1956)
- (55) NOVIKOFF A.B., BURNETT F., GLICKMAN M. Some problems in localizing enzymes at the electron microscope level. J. Histochem. and Cytochem., 4, 416 (1956)
- (56) NOVIKOFF A.B., SHIN W.Y., DRUCKER J. Mitochondrial localization of oxydative enzymes, staining results with two tetrazolium salts. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 47-61, 1961
- (57) OBERLING C., ROUILLER C. Les effets de l'intoxication aigue au tétrachlorure de carbone sur le foie de rat ; étude au microscope électronique. Ann. Anat. Path., <u>1</u>, 401-427 (1956)
- (58) PALADE G.E. The fine structure of mitochondria. Anat. Rec. <u>114</u>, 427-449 (1952)
- (59) PALADE G.E. The fine structure of mitochondria. J. Histochem. Cystochem., 1, 188-211 (1953)
- (60) PALADE G.E. Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmic structures. In "enzymes: Units of biological structure and function". O.H. Gaebler. ed. p. 185-205. Academic Press N.Y.

- (61) PALADE G.E. Functional changes in the structure of cell components. In : Subcellular particles, Hayashi, ed. p. 64. Ronald Press N.Y. (1959)
- (62) PEARSE A.G.E., SCARPELLI D.G. Intramitochondrial localization of oxidative enzyme systems. Exp. Cell Res., suppl. nº 7, 50-64 (1959)
- (63) POLONOVSKI J. Les lipoprotéines cellulaires et leurs fonctions enzymatiques. Ann. d'Histochimie, <u>6</u>, 379-400 (1961)
- (64) PORTER K.R., BRUNI C. An electron microscope study of the early stages of 3' Me DAB on rat liver cells. Cancer Res., 19, 997-1010 (1959)
- (65) POTTER V.R. Fed. Proc., <u>17</u>, 691 (1958)
- (66) POTTER V.R. Acta Un. Inter. Cancr., 16, 27 (1960)
- (67) RHODIN J. Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convoluted Tubule Cells of the Mouse Kidney. Karolinska Instituted. Stockholm, Aktiebolaget Godirl., 1, 1954
- (68) ROUILLER C. Les canalicules biliaires. Etude au microscope électronique. C.R. Soc. Biol., 148, 2008 (1954)
- (69) ROUILLER C. Contribution de la microscopie électronique à l'étude du foie normal et pathologique. Ann. Anat. Path., 2, 548-562 (1957)
- (70) ROUILLER C. Physiological and pathological changes in mitochondrial morphology. Bourne G.H., Danielli J.F. Academic Press. Intern. Review of Cytology, 9, 277-292 (1960)
- (71) ROUILLER C., BERNHARD W. "Microbodies" and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2 (suppl.) 355-360 (1956)
- (72) ROUILLER C., GANSLER H. Contribution à la pathologie des Mitochondries (résumé): Bull. Microscop. Appl., 5,17-18 (1955)
- (73) ROUILLER C., SIMON G. Contribution de la microscopie électronique au progrès de nos connaissances en cytologie et en histopathologie hépatique. Revue intern. d'hépatologie, 12, 167-206 (1962)
- (74) SEDAR A.W., ROSA C.G. Cytochemical demonstration of the succinic dehydrogenase system with the electron microscope using Nitro Blue Tetrazolium. J. Ultrastruct. Res., 5, 226 (1961)
- (75) SEGARD E. à paraitre.
- (76) SJOSTRAND F.S. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes: ultrastructure of rod-shaped Mitochondria, systems of double membranes in the cytoplasm of certain tissue cells. Nature, London, 171, 30-32 (1953)

- (77) SJOSTRAND F.F. Int. Rev. Cytol., 5, 455, 1956
- (78) SJOSTRAND F.F., RHODIN J. The ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as revealed by high resolution electron microscopy. Exp. Cell.Res., 4, 436-456, 1953
- (79) STOECKENIUS W. Structure of the myeline figures and micro-emulsions as observed with electron microscope. J. Biophysic. Biochem. Cytol., <u>5</u> 491-500, 1959
- (80) THEMANN H., HAKE Th. Electronenmicroscopischer nachweis der phosphoamidase Z. Naturforsch., 16, 226-227, 1961
- (81) TUJIMURA H. Electron microscopic studies on the DAB (p-diméthylaminoazobenzène) induced hepatoma. I. Fine structure of rate liver cells. Med. J. Osaka Univers., 9, 115-129, 1958
- (82) TUJIMURA H. Electron microscopic studies on the DAB (p-dimethylaminoazobenzene) induced hepatoma. II Fine structure of rate liver cells in the course of development of DAB in induced hepatoma. Med. J. Osaka Univers., 9, 135-140, 1958
- (83) TUJIMURA H. Electron microscopic studies on the DAB (p-dimethylaminoazobenzene) induced hepatomas cells. Med.J. Osaka. Univers., 9, 147-155, 1958
- (84) VERNE J. Précis d'histologie La cellule Les tissus les organes Masson & Cie, Ed., Paris, 1950
- (85) WARBURG O. On the origine of cancer cells. Science, 123, 309-314, 1956
- (86) WEINHOUSE S. Advances cancer Res. 3, 269, 1955
- (87) WEINHOUSE S. On respiratory impairment in cancer cells. Science, 124, 267-269, 1956
- (88) WEIS J.N. J. of Exp. Med., 102, 783, 1955
- (89) WITTER R.F., WATSON M.L., COTTONE M.A. Morphology and A.T.P. ase of isolated mitochondria. J. Biophys. Biochemic. Cytol. 1, 127-138, 3/25/55
- (90) WOHLFARTH-BOTTERMAN K.E. Die Entstehung, die Vermehrung und die Abscheidung geformten Sekrete der Mitochondrien von Parameciun. Electr. Micr. Stockholm Conf. p. 137, 1956
- (91) ANDRE J. Contribution à la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse. J. Ultrastruc. Res. Suppl. 3, 1962