

N° D'ORDRE : 423

50376  
1978  
51

50376  
1978  
51

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

# THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

JEAN-CLAUDE BEAUVILLAIN

## CARACTÉRISATION A L'ÉCHELLE ULTRASTRUCTURALE DES CELLULES ADENOHYPOPHYSAIRES INDIVIDUALISÉES PAR DIFFÉRENTES TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES

(ÉTUDE CHEZ LE COBAYE ET LE LÉROT)



SOUTENUE LE 7 JUILLET 1978 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

MM.	M.	DURCHON	<i>PRÉSIDENT</i>
	M.-P.	DUBOIS	<i>RAPPORTEUR</i>
	M.	MAZZUCA	<i>RAPPORTEUR</i>
	J.	RACADOT	<i>RAPPORTEUR</i>
M <sup>me</sup>	A.	TIXIER-VIDAL	<i>EXAMINATEUR</i>
MM.	J.	BARRY	<i>EXAMINATEUR</i>
	A.	DHAINAUT	<i>EXAMINATEUR</i>

DOYENS HONORAIRES De L'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit  
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, H.PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie

M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétale
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEPRez Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mme MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M. AL- FAKIR Sabah	Algèbre
M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Géologie
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. FONTAINE Jacques	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. HOUDART René	Physique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MALAUSSENA DE PERSO Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NOTELET Francis	Electrotechnique
M. NUSSENBAUM Maurice	Sciences Economiques
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée

M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PETIT Francis	Chimie Organique
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RICHARD Alain	Biologie
M.	RIETSCH François	Chimie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse
M.	ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
Mme	SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SOMME Jean	Géographie
Mlle	SPIK Geneviève	Biochimie
M.	STERBOUL François	Informatique
M.	TAILLIEZ Roger	Biologie
M.	THERY Pierre	Electronique
M.	TOP Gérard	Sciences Economiques
M.	TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M.	TREANTON Jean-René	Sociologie
M.	VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M.	VILLETTE Michel	Mécanique
M.	WALLART Francis	Chimie
M.	WERNER Georges	Informatique
Mme	ZIN-JUSTIN Nicole	Algèbre

J'aimerais que Monsieur le Professeur DURCHON qui m'a fait l'Honneur de présider ce jury trouve dans ces quelques lignes l'expression de ma profonde admiration.

Son autorité en matière de Biologie mais aussi ses qualités humaines m'ont incité à aller souvent le consulter. Ses conseils ont beaucoup influencé le choix de ma carrière et la réalisation de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur BARRY de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fait suffisamment confiance pour m'intégrer dans l'Equipe de Recherche dont il est le Directeur. Par ses activités scientifiques et son enthousiasme il m'a stimulé dans la réalisation de ce travail.

Qu'il me soit permis d'exprimer à Monsieur le Professeur MAZZUCA ma très sincère reconnaissance pour avoir accepté de m'initier aux techniques de microscopie électronique. Il a suscité ce travail, a suivi sa réalisation et a contribué à sa présentation.

Sa rigueur d'esprit et sa minutie ont été pour moi des exemples que je n'oublierai pas dans la poursuite de ma carrière.

De la même façon je ne pourrai jamais oublier l'aide de Monsieur le Docteur DUBOIS. Sa très grande compétence mais aussi sa gentillesse font qu'il est très sollicité. Malgré cela, il nous a toujours fourni dès leur fabrication les anticorps si précieux. Sans lui ce travail aurait été impossible à réaliser et je suis très heureux de pouvoir lui exprimer ici mon très profond attachement

Il m'est agréable de remercier Monsieur le Professeur RACADOT d'avoir bien voulu être rapporteur de cette thèse. Sa très grande compétence en cytologie hypophysaire me rend son jugement important et ses conseils particulièrement précieux.

A Madame TIXIER-VIDAL qui m'a fait l'Honneur de bien vouloir examiner ce travail, j'exprime ma gratitude. Ses importants résultats scientifiques notamment dans le domaine de l'immunocytoenzymologie ont largement contribué à l'orientation de ce travail.

Je suis reconnaissant à Monsieur le Professeur DHAINAUT qui en sa qualité de spécialiste de microscopie électronique a bien voulu juger cette thèse.

A Monsieur le Professeur VIVIER qui n'a malheureusement pas pu participer à ce Jury, je souhaite un prompt rétablissement.

Je remercie également Gérard TRAMU qui travaillant sur l'adénohypophyse avant moi a su me fournir les bases nécessaires. C'est avec lui que la technique de superposition a été mise au point. Sa compagnie est toujours agréable et fructueuse.

Je tiens à rendre hommage à Madame MAZZUCA qui a également contribué à ma formation lorsque je suis arrivé au Laboratoire.

Pour l'aide que Dominique QUIEF, Mademoiselle LE CLAIRE et Mademoiselle BAHEUX ont bien voulu m'apporter dans diverses circonstances je les remercie très vivement.

## S O M M A I R E

INTRODUCTION.....	p. 1
MATERIEL ET METHODES.....	p. 5
A/ Choix des mammifères.....	p. 5
B/ Points communs aux techniques utilisées.....	p. 5
1- le prélèvement.....	p. 5
2- les fixateurs.....	p. 6
3- durée des fixations.....	p. 7
4- l'inclusion.....	p. 7
5- les anticorps: préparation et contrôle de leur spécificité.....	p. 8
a/ préparation de l'antigène.....	p. 8
b/ protocole d'immunisation et conservation...	p. 9
c/ utilisation.....	p. 10
d/ contrôle de spécificité.....	p. 10
C/ Description de la technique permettant l'individualisation des types cellulaires par superposition d'observations de microscopie photonique et électronique.....	p. 17
1- principe.....	p. 17
2- description de la technique.....	p. 18
a/ coupes.....	p. 18
b/ traitement des coupes semi-fines.....	p. 18
c/ réaction immunocytochimique.....	p. 19
d/ coloration des coupes semi-fines.....	p. 21
e/ traitement de la coupe ultrafine.....	p. 21
3- superpositions.....	p. 21
a/ immunofluorescence - microscopie électronique.....	p. 21
b/ immunoperoxydase - microscopie électronique.....	p. 22
4- avantages et inconvénients de la technique des superpositions.....	p. 22

D/	Technique immunocytoenzymologique sur coupe ultrafine.....	p. 23	
	1- but de la technique.....	p. 23	
	2- principe.....	p. 23	
	3- avantages et inconvénients.....	p. 25	
E/	Technique immunocytochimique sur coupes à congélation.....	p. 26	
	1- mode opératoire.....	p. 26	
	2- avantages et inconvénients.....	p. 27	
F/	Réactions générales de contrôles.....	p. 27	
L E S.	C E L L U L E S	C O R T I C O T R O P E S.....	p. 29
A/	Etat des connaissances concernant la structure fine de ce type cellulaire au début de nos travaux.....		p. 29
B/	Etat des travaux de nature immunohistochimique en microscopie photonique.....		p. 30
C/	Résultats obtenus par l'application des techniques immunocytochimiques à la microscopie électronique.....		p. 32
D/	Données récentes sur les cellules corticotropes.....		p. 33
E/	Recherches personnelles.....		p. 35
	1- points particuliers sur les méthodes utilisées....		p. 35
	2- résultats.....		p. 36
	a/	les cellules corticotropes du Lérot.....	p. 36
		$\alpha$ - technique de superposition.....	p. 36
		- coupes semi-fines.....	p. 36
		- coupes ultrafines.....	p. 37
		$\beta$ - technique immunocytochimique sur coupes ultrafines.....	p. 38
	b/	les cellules corticotropes du Cobaye.....	p. 39
		$\alpha$ - technique de superposition.....	p. 39
		- coupes semi-fines.....	p. 39
		- coupes ultrafines.....	p. 40
		$\beta$ - technique immunocytochimique sur coupes ultrafines.....	p. 41
		$\gamma$ - technique immunocytochimique sur coupes au cryostat.....	p. 42

3- discussion.....	p. 43
CONCLUSIONS.....	p. 50
 L E S C E L L U L E S G O N A D O T R O P E S.....	 p. 52
A/ Etat des connaissances concernant la structure fine de ce type cellulaire au début de nos travaux.....	p. 52
1- les cellules à FSH.....	p. 53
2- les cellules à LH.....	p. 53
B/ Etat des travaux de nature immunohistochimique en microscopie photonique.....	p. 53
C/ Résultats obtenus par l'application des techniques immuno- cytochimiques à la microscopie électronique.....	p. 55
D/ Données récentes.....	p. 56
E/ Recherches personnelles.....	p. 58
1- Résultats.....	p. 59
a/ les cellules gonadotropes du Lérot.....	p. 59
$\alpha$ - technique des superpositions.....	p. 59
- coupes semi-fines.....	p. 59
- coupes ultrafines.....	p. 59
$\beta$ - technique immunocytochimique sur coupes ultrafines.....	p. 60
- avec l'anti LH totale ovine et l'anti LH $\beta$ porcine.....	p. 60
- avec l'anti FSH $\beta$ de Rat.....	p. 61
b/ les cellules gonadotropes du Cobaye.....	p. 61
$\alpha$ - technique des superpositions.....	p. 61
- coupes semi-fines.....	p. 61
- coupes ultrafines.....	p. 62
$\beta$ - technique immunocytochimique sur coupes ultrafines.....	p. 63
- avec l'anti LH $\beta$ .....	p. 63
- avec l'anti FSH $\beta$ .....	p. 63
$\gamma$ - technique immunocytochimique après congélation.....	p. 64
2- discussion.....	p. 65
CONCLUSIONS.....	p. 71

## LES CELLULES THYREOTROPES

A/ Etat des connaissances concernant la structure fine de ce type cellulaire au début de nos travaux.....	p. 72
B/ Etat des travaux de nature immunohistochimique en microscopie photonique.....	p. 73
C/ Résultats obtenus par l'application des techniques immunocytochimiques à la microscopie électronique.....	p. 74
D/ Recherches personnelles.....	p. 76
1- points particuliers sur les méthodes employées....	p. 76
2- résultats.....	p. 76
a/ technique des superpositions.....	p. 76
- coupes semi-fines.....	p. 76
- coupes ultrafines.....	p. 77
b/ technique immunocytochimique sur coupes ultrafines.....	p. 78
c/ technique immunocytochimique sur coupes au cryostat.....	p. 79
3- discussion.....	p. 80
CONCLUSIONS.....	p. 84

## LES CELLULES A PROLACTINE.....

p. 85

A/ Etat des connaissances concernant la structure fine de ce type cellulaire au début de nos travaux.....	p. 85
B/ Etat des travaux de nature immunohistochimique en microscopie photonique.....	p. 86
C/ Résultats obtenus par l'application des techniques immunocytochimiques à la microscopie électronique.....	p. 87
D/ Données récentes sur les cellules à prolactine.....	p. 88
E/ Recherches personnelles.....	p. 90
1- points particuliers sur les méthodes utilisées....	p. 90
2- résultats.....	p. 90
a/ technique de superpositions.....	p. 90
- coupes semi-fines.....	p. 90
- coupes ultrafines.....	p. 91

b/ technique immunocytochimique sur coupes ultrafines.....	p. 93
c/ technique immunocytochimique sur coupes au cryostat.....	p. 93
2- Discussion.....	p. 94
CONCLUSIONS.....	p. 99
LES CELLULES SOMATOTROPES.....	p. 100
A/ Etat des connaissances concernant la structure fine de ce type cellulaire au début de nos travaux.....	p. 100
B/ Etat des travaux de nature immunohistochimique en microscopie photonique.....	p. 101
C/ Résultats obtenus par l'application des techniques immuno- cytochimiques à la microscopie électronique.....	p. 102
D/ Données récentes sur le mode d'élaboration de la STH.....	p. 103
E/ Recherches personnelles.....	p. 105
1- résultats.....	p. 105
a/ technique des superpositions.....	p. 105
- coupes semi-fines.....	p. 105
- coupes ultrafines.....	p. 105
b/ technique immunocytochimique sur coupes ultrafines.....	p. 106
c/ technique immunocytochimique sur coupes au cryostat.....	p. 107
2- discussion.....	p. 107
CONCLUSIONS.....	p. 109
CONCLUSION GENERALE .....	p. 110
BIBLIOGRAPHIE	

LISTE DES ABREVIATIONS  
(correspondent aux initiales anglo-saxones)

ACTH	hormone corticotrope
MSH	hormone mélanotrope
LPH	lipotropine
STH	hormone somatotrope
LTH	prolactine
LH	hormone lutéinisante
FSH	hormone folliculostimulante
HCG	gonadotrophine chorionique humaine
PMSG	gonadotrophine de jument gravide
TSH	hormone thyroïdienne
BSA	serum albumine bovine
HSA	serum albumine humaine
PAF	acide picrique-paraformaldéhyde
PAP	complexe peroxydase-anti peroxydase
DAB	diamino-benzidine

La connaissance de la cytologie hypophysaire a passionné de nombreux chercheurs et a progressé par paliers au fur et à mesure qu'apparaissaient des techniques nouvelles.

Avant 1940, n'utilisant que des méthodes de coloration générale (trichrome, May-Grünwald Giemsa), on décrivait des cellules éosinophiles, des cellules cyanophiles et des cellules chromophobes (Schönemann, 1892).

C'est alors que Romeïs(1940) en utilisant la méthode au crésazan démontre qu'il existe en fait plusieurs types cellulaires distincts à l'intérieur de chaque catégorie acidophile et basophile.

Par la suite vont apparaître de nouvelles colorations signalétiques (Revue dans Girod 1976) dont l'une des principales, le tétrachrome de Herlant (1940) modifié par Racadot (1962) va constituer une technique de base employée par de très nombreux cytologistes.

Parallèlement à l'essor de ce type d'approche, des techniques histochimiques sont mises au point. D'abord la méthode à l'acide périodique Schiff (Catchpole, 1947, 1948, 1949; Pearse, 1948, 1949; Herlant, 1949); la méthode à la fuschine paraldéhyde (Halmi, 1950, 1951; Purves et Griesbach, 1951), la méthode au bleu-alcian (Herlant et Racadot, 1957).

Les premiers à avoir utilisé le microscope électronique pour l'étude de l'adénohypophyse sont Fernandez Moran et Luft en 1949. En fait, ce sont surtout les travaux de Rinehart et Farquhar (1953) puis de Farquhar et Rinehart (1954) qui vont être à l'origine

de toute une série de recherches à l'échelle ultrastructurale sur l'hypophyse.

Dès 1951, grâce à Marshall, une nouvelle ouverture survient. Cet auteur applique en effet sur l'hypophyse les techniques d'immunofluorescence. L'obtention d'anticorps spécifiques posant de nombreux problèmes, ce ne sera cependant que dix ans plus tard que ces techniques prendront un essor considérable.

Elles apparaissent alors comme le moyen le plus direct et le plus sûr, si l'on prend suffisamment de précautions, pour étudier les types cellulaires de l'hypophyse en microscopie photonique.

En microscopie électronique les problèmes de caractérisation des cellules de l'adénohypophyse n'avaient pas été résolus avec certitude essentiellement pour deux raisons:

-premièrement tous les types cellulaires avaient été identifiés de façon indirecte; soit dans des conditions expérimentales (ablation d'organes-cibles ou emploi de drogues) ou physiologiques particulières (cycle, lactation, gestation) ou même par comparaison avec des cellules observées dans des conditions pathologiques (adénome).

-deuxièmement la grande majorité des travaux initiaux avaient été pratiqués sur l'adénohypophyse de Rat. Celle-ci était un peu considérée comme "étalon"; des types cellulaires d'adénohypophyse d'espèces différentes étaient décrits par simple analogie entre leur aspect et celui observé chez le Rat. Il est frappant de constater qu'au colloque du CNRS de 1963 toutes les observations avaient été effectuées chez le Rat à l'exception de celles d'Herlant poursuivies sur les adénohypophyses de la Chauve Souris, de la Taupe et de celles de Barnes sur la Souris.

L'application des techniques immunocytochimiques à la microscopie électronique paraît alors une méthode pouvant permettre

d'une manière directe d'individualiser dans des conditions physiologiques les différents types cellulaires de l'adénohypophyse chez de nombreuses espèces.

Si cette application a tardé à apparaître, c'est que de nombreux problèmes se posaient par rapport à la microscopie photonique, notamment celui du marqueur et celui de la fixation qui devait à la fois préserver les sites antigéniques tout en conservant le mieux possible la structure fine.

La ferritine d'abord utilisée comme marqueur (Singer 1959) était intéressante pour la détection d'antigènes de surface (Duc Nguyau 1966) mais son poids moléculaire très élevé (650 000) rendait son utilisation difficile pour la détection d'antigènes intracellulaires.

C'est alors qu'Avrameas et Uriel (1966) en même temps que Nakane et Pierce (1966) introduisent une enzyme, la peroxydase, qui se révèle être un excellent marqueur en microscopie photonique. En 1967 Nakane et Pierce adaptent la technique pour la microscopie électronique et en 1970 paraissent les premières publications sur l'adénohypophyse (Kawarai et Nakane 1970; Nakane 1970).

A l'heure actuelle la plupart des techniques immunocytoenzymologiques appliquées à la microscopie électronique dérivent de ces travaux et les bases de la plupart d'entre elles ont pratiquement été élaborées par cette école. Les modifications ultérieures concerneront soit la partie histologique de la manipulation (fixation, fabrication des coupes, milieu d'inclusion), soit la partie immunohistochimique.

Une méthode nouvelle est apparue en 1972; décrite par Moriarty et Halmi, elle utilise le complexe peroxydase anti peroxydase dû à Sternberger (1970) directement sur coupes ultrafines.

Cependant dans la majorité des cas les modes de fixation permettent difficilement d'obtenir une bonne conservation

des tissus et par conséquent de bonnes images en microscopie électronique.

Par ailleurs, d'une façon générale, seules les granulations sont bien caractérisées alors que les organites cellulaires sont souvent peu visibles.

Il faut ~~aussi~~ signaler que là encore, tous ces travaux furent effectués sur l'adénohypophyse du Rat (Kawarai et Nakane, 1970; Nakane, 1970; Tougard et coll, 1973; Moriarty et Halmi, 1973).

Il nous a donc semblé utile de faire une étude précise de la structure fine de l'adénohypophyse d'autres mammifères en utilisant l'avantage des techniques immunocytochimiques.

Cependant, nous avons voulu utiliser une méthode qui permette de caractériser à l'échelle ultrastructurale tous les éléments de la cellule.

Cette technique que nous avons pu mettre au point est basée sur le principe de la superposition d'observations en microscopie photonique et en microscopie électronique. Elle permet de garder l'avantage des techniques immunocytochimiques et de la microscopie électronique classique.

De cette façon, tous les types cellulaires de l'adénohypophyse du Cobaye ainsi que les cellules gonadotropes et corticotropes du Lérot ont été individualisées.

Cette étape étant réalisée, nous avons voulu alors préciser la localisation intracellulaire des hormones en utilisant les méthodes déjà employées pour l'étude de l'adénohypophyse de Rat.

MATERIEL ET METHODES

### A/ Choix des Mammifères

La majorité des recherches du laboratoire se faisant sur le Cobaye, nous avons également étudié la structure fine de l'adénohypophyse de cette espèce. Par ailleurs aucune observation n'avait été effectuée sur ce mammifère en microscopie électronique. Nous avons utilisé des mâles pour éviter les variations morphologiques liées au cycle. Une exception a été faite pour l'étude des cellules à prolactine pour lesquelles nous avons utilisé des femelles.

Les cellules gonadotropes et corticotropes du Lerot, mammifère hibernant, ont également été caractérisées. Aussi bien pour l'étude des cellules corticotropes que pour les cellules gonadotropes, nous avons observé des adénohypophyses de mâles à différentes périodes de l'année (hibernation, printemps, été).

Tous les animaux ont été sacrifiés vers 10 heures du matin.

### B/ Points communs aux techniques utilisées

#### 1- Le prélèvement

Les animaux sont décapités sans anesthésie et la calotte crânienne est réséquée rapidement. L'encéphale est sectionné frontalement entre le cerveau et le cervelet et on ne garde que la région antérieure.

Il est alors possible de passer de fins ciseaux entre les os de la base du crâne et la portion inférieure du cerveau afin de décoller l'hypophyse.

Dès cet instant on peut injecter directement sur l'hypophyse le fixateur à l'aide d'une seringue.

L'ensemble de cette opération dépasse rarement deux minutes. Le cerveau est alors mis sur une lame de verre (face supérieure contre la lame).

La région infundibulaire et l'hypophyse sont alors séparées du reste de l'hypothalamus et les fragments sont plongés dans le fixateur puis redécoupés afin de faciliter la pénétration du fixateur.

## 2 - Les fixateurs

### a/ Mélange glutaraldéhyde-paraformaldéhyde

Le fixateur préconisé par Karnovsky (1965) a été modifié. Une solution de cacodylate de sodium 0,08 M à 4p 100 de glutaraldéhyde et de 2,2 p 100 de paraformaldéhyde est utilisée. Soit pour 25 cc de solution de fixateur:

- 10 ml de cacodylate 0,2 M pH : 7,4
- 4 ml de glutaraldéhyde à 25 p 100
- 11 ml de paraformaldéhyde à 5 p 100
- 2 gouttes de CaCl<sub>2</sub> à 5 p 100

### b/ Mélange de paraformaldéhyde et d'acide picrique (P.A.F.) selon Stéfanini et Coll. (1967)

20 g de paraformaldéhyde sont dissous dans 150 ml de solution d'acide picrique saturée et filtrée deux fois. Il faut chauffer à 60°C. et ajouter de la soude normale. Après filtration on complète à 1000 cc avec du tampon phosphate.

Tampon phosphate:

Pour 1000 cc : 3,31 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O  
45,09 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O

Ce tampon a un pH de 7,3

Etant donné la forte osmolarité de ce fixateur Mazzuca a préconisé de diluer le tampon de moitié afin de se rapprocher de l'osmolarité des fixateurs utilisés classiquement.

### c/ Glutaraldéhyde

Une solution à 2,5 p 100 de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate 0,1 M a été utilisée.

### d/ Post-fixateur osmique

Le fixateur osmique a toujours été une solution à 1 p 100 de tétroxyde d'osmium dans un tampon cacodylate 0,1 M

### 3 - Durée des fixations

<u>Fixateur</u>	<u>Durée</u>
Gluta-Formol	2 à 4 h
P. A. F.	2 à 8 h
Glutaraldéhyde	4 h
Tétroxyde d'Osmium	2 h

### 4 - L'inclusion

Le milieu d'inclusion a été l'araldite utilisé selon la méthode de Richardson et coll (1960).

L'inclusion finale se fait à plat, ce qui nous permet d'obtenir généralement une bonne orientation de nos fragments.

D'autres milieux d'inclusion ont été essayés, notamment

le styrène méthacrylate et le glycolméthacrylate.

Avec le styrène méthacrylate nos résultats ont toujours été négatifs.

Par contre avec le glycolméthacrylate nous avons obtenu des résultats positifs mais la conservation des tissus n'a jamais été excellente.

#### 5 - Les Anticorps: Préparation et Contrôle de leur spécificité

La préparation des anticorps ainsi que leurs tests de spécificité ont été effectués par le Docteur M.P. Dubois au centre de recherches de l'I.N.R.A. à Nouzilly.

##### a/ Préparation de l'antigène

- *Molécules protidiques et glycoprotéïques à poids moléculaire supérieur ou égal à 10 000: hormones gonadotropes, thyroïotropes, somatotropes, à prolactine.*

L'antigène est dissous dans du serum physiologique et émulsionné avec un volume égal d'adjuvant de Freund.

- *Molécules polypeptidiques à poids moléculaire inférieur à 10 000 : hormones à activités corticotropes.*

Les hormones de synthèse sont couplées avec une protéine porteuse (serum albumine bovine ou serum albumine humaine) par l'intermédiaire du glutaraldéhyde selon la technique de Vance et coll. (1968).

M.P. Dubois (1971) procède de la façon suivante (exemple pour le  $\beta$  1-24 ACTH) :

- 26 mg de B.S.A. sont dissous dans 2,7 ml de tampon phosphate 0,1 M pH: 7,2

- 6 mg de  $\beta$  1-24 ACTH de synthèse sont dissous dans 0,4 ml de serum physiologique.

- 1 ml d'une solution de glutaraldéhyde 0,02 M (dans le tampon phosphate) est ajouté goutte à goutte au mélange B.S.A. corticotropine maintenu en agitation pendant une heure.

- L'ensemble est ensuite dialysé pendant 48 heures en présence de soluté salé.

- Le volume du dialysat est ajusté à 10 ml, réparti en ampoules scellées et conservées au congélateur à  $-18^{\circ}$  C.

Pour obtenir l'immunisation cet antigène est couplé et émulsionné avec l'adjuvant de Freund (1 ml d'antigène pour 1,5 ml d'adjuvant).

#### b/ Protocole d'immunisation et conservation

L'immunisation se fait par inoculation de 0,1 à 0,2 ml de l'émulsion sur le dos rasé de Lapins. Ceux-ci sont inoculés ainsi une fois par semaine, quatre semaines de suite.

Après un mois de repos, un rappel par voie veineuse avec l'antigène seul (2 ml) est effectué.

Les animaux sont alors saignés les 5ème et 7ème jours suivants. Les serums sont décomplémentés à  $56^{\circ}$  C pendant 30mn et conservés au congélateur. Ils peuvent aussi être gardés à  $-18^{\circ}$  C glycélinés volume à volume.

### c/ Utilisation

Elle se fait toujours après saturation par l'anticorps de la protéine porteuse (soit H.S.A., soit B.S.A.).

### d/ Contrôles de spécificité

Les tests utilisés pour établir la spécificité des anticorps ont été d'ordres différents:

- *tests sérologiques*:
  - immunoprécipitation
  - immunoélectrophorèse
  - radioimmunologie
  - fixation du complément
  - immunohémolyse passive indirecte

- *test immunocytologique*: inhibition de la réaction sur coupes par l'antigène purifié et non inhibition par d'autres antigènes.

- *test physiologique*: inhibition par l'antisérum de la fonction endocrine propre à l'antigène.

Les tests d'immunoprécipitation et d'immunoélectrophorèse sont utilisables à condition que l'anticorps soit précipitant. La mise en évidence d'un éventuel contaminant dans l'antigène que l'on injecte peut donc être difficile si l'anticorps dirigé contre cet antigène n'est pas précipitant.

Nous rapporterons pour chaque type d'anticorps utilisé les tests les plus significatifs effectués par le Docteur M.P. Dubois.

L'ensemble des contrôles a été publié: Dubois M.P.

TABLEAU N° 1

INHIBITION PAR LES ANTIGENES HOMOLOGUES ET HETEROLOGUES DES REACTIONS  
D'IMMUNOFLORESCEINE INDUITS PAR DIFFERENTS ANTICORPS  
(CHEZ LES OVINS, BOVINS ET PORCINS)

PD : pars distalis  
PI : pars intermedia

Anticorps Antigène	$\beta$ 1-24 ACTH		$\alpha$ 17-39 ACTH		$\beta$ MSH		$\beta$ LPH		$\beta$ endorphine	
	PD	PI	PD	PI	PD	PI	PD	PI	PD	PI
$\beta$ 1-24 ACTH (synthétique)	-	-	++++	+++	+++	++	++++	++	-	-
$\alpha$ 17-39 ACTH (synthétique)	-	-	-	-	+++	++	++++	++	-	-
$\beta$ -MSH (synthétique)	+++	+	++++	+++	-	-	++++	++	-	-
$\beta$ LPH	+++	+	++++	++	++	+	-	-	-	-
$\beta$ endorphine							++	++		

Pour l'anti  $\alpha$ -17-39 ACTH les tests sérologiques n'ont pas pu être effectués faute d'antigènes.

Tests immunocytologiques: les résultats de l'inhibition des réactions d'immunofluorescence ont été résumés dans le tableau n°1 initialement publié par Dubois P. et coll (1973).

#### - Anti gonadotropines

Les tests sérologiques ont été effectués pour l'anti LH ovine et l'anti LH  $\beta$  porcine: -fixation du complément (Dubois M.P. 1971b)  
-étude radioimmunologique (Dubois P. et Dubois M.P. 1974).

Nous rapporterons ces derniers résultats:

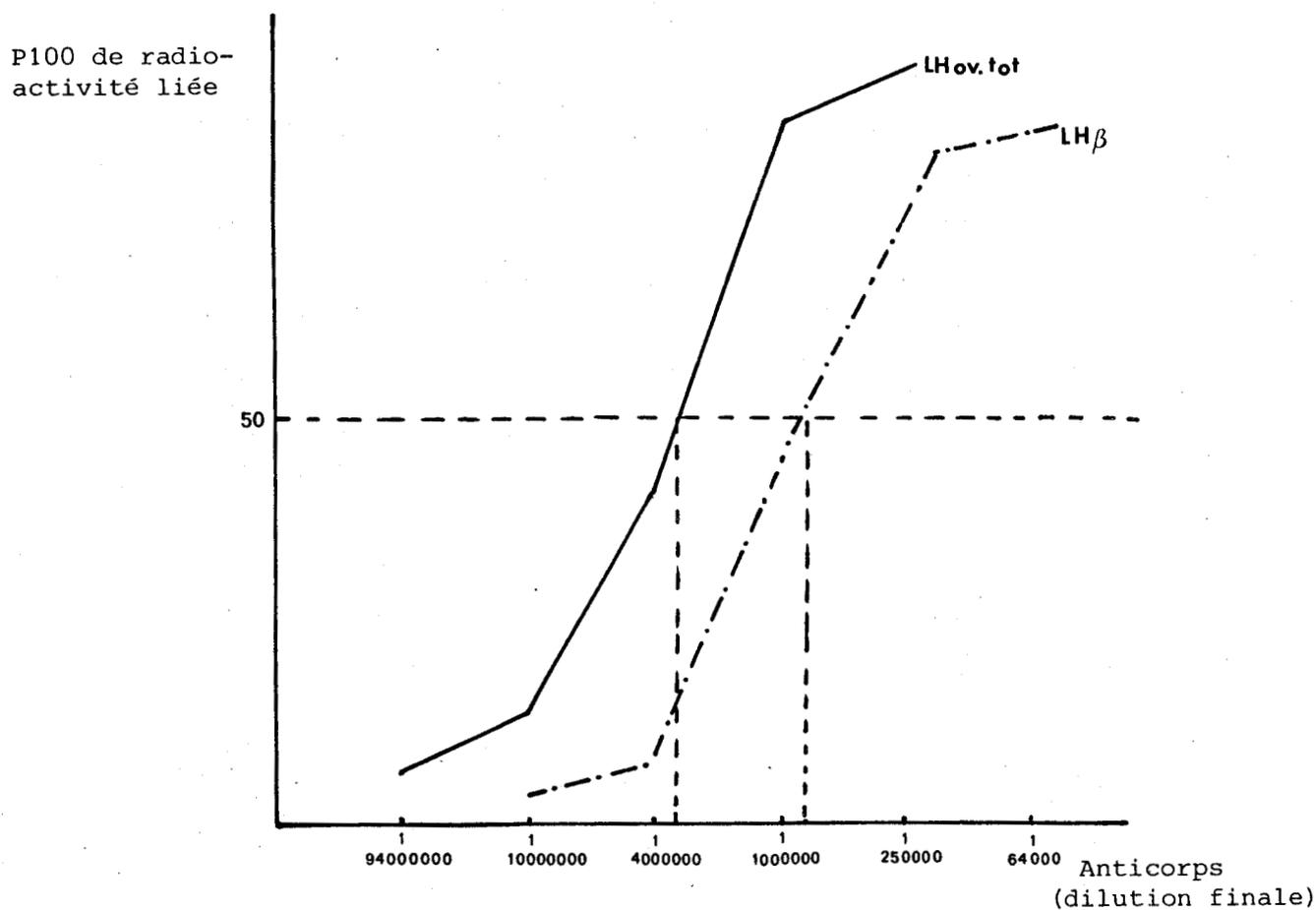


Fig. 2; Titrage de l'anticorps anti LH ovine totale vis à vis des traceurs LH ovine totale et LH  $\beta$  porcine.

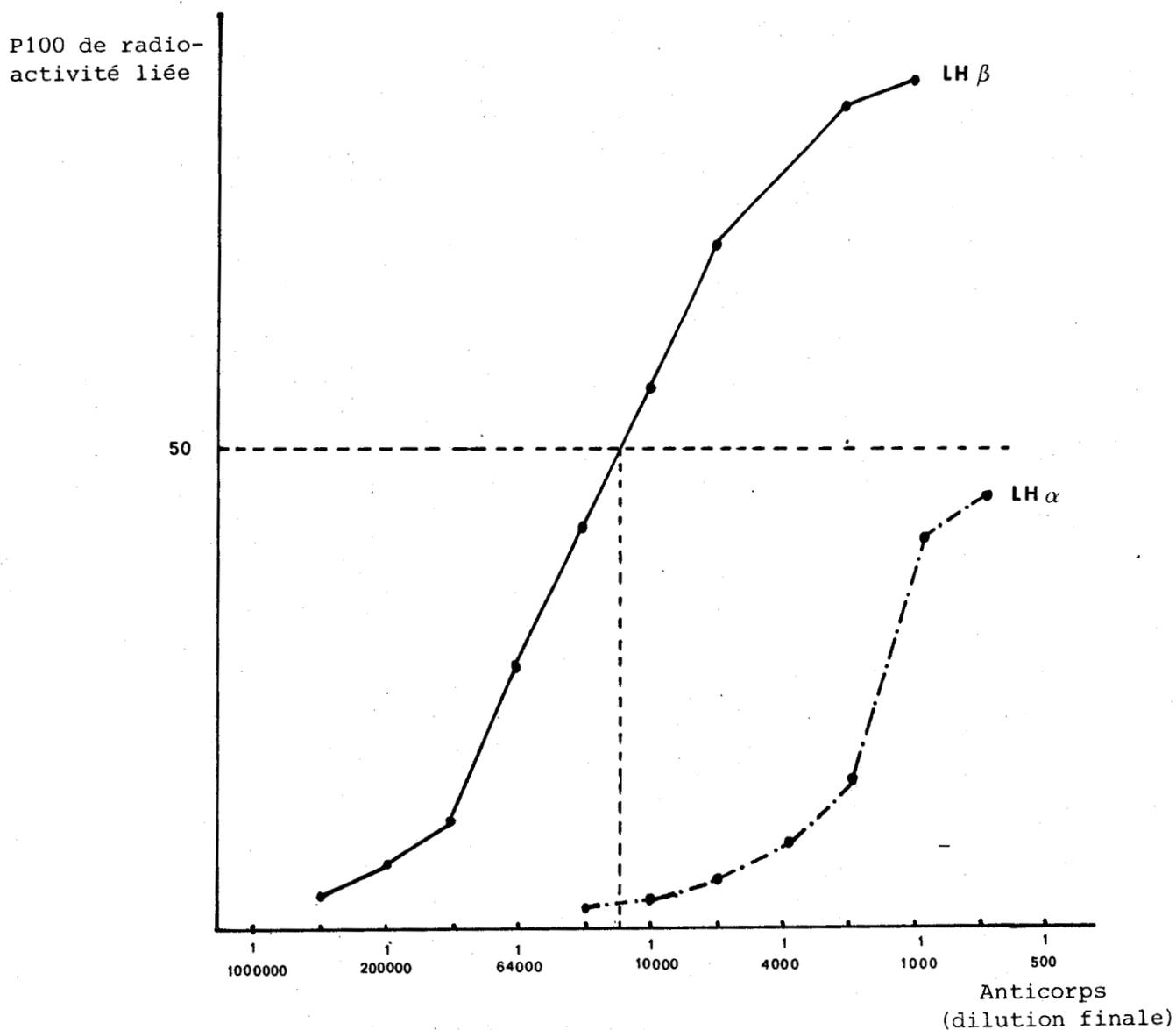


Fig. 3; Titrage de l'anticorps anti LH  $\beta$  porcine vis à vis des traceurs LH  $\beta$  porcine et LH  $\alpha$  porcine.

L'analogie des pentes est compatible avec la présence d'un contaminant LH  $\alpha$  dans LH  $\beta$  de l'ordre de 0,006%. Par ailleurs l'anticorps anti LH  $\beta$  porcine ne réagit pas avec la FSH humaine radioactive.

Pour l'anti PMSG le titrage a été réalisé avec la méthode d'immunohémolyse passive indirecte qui a révélé l'existence d'un titre important d'anticorps anti PMSG (Tramu 1974).

L'anti FSH  $\beta$  : cet anticorps a été fourni par le Docteur



Parlow (N.I.H.). Les tests radioimmunologiques effectués nous ont été fournis: fig. 4.

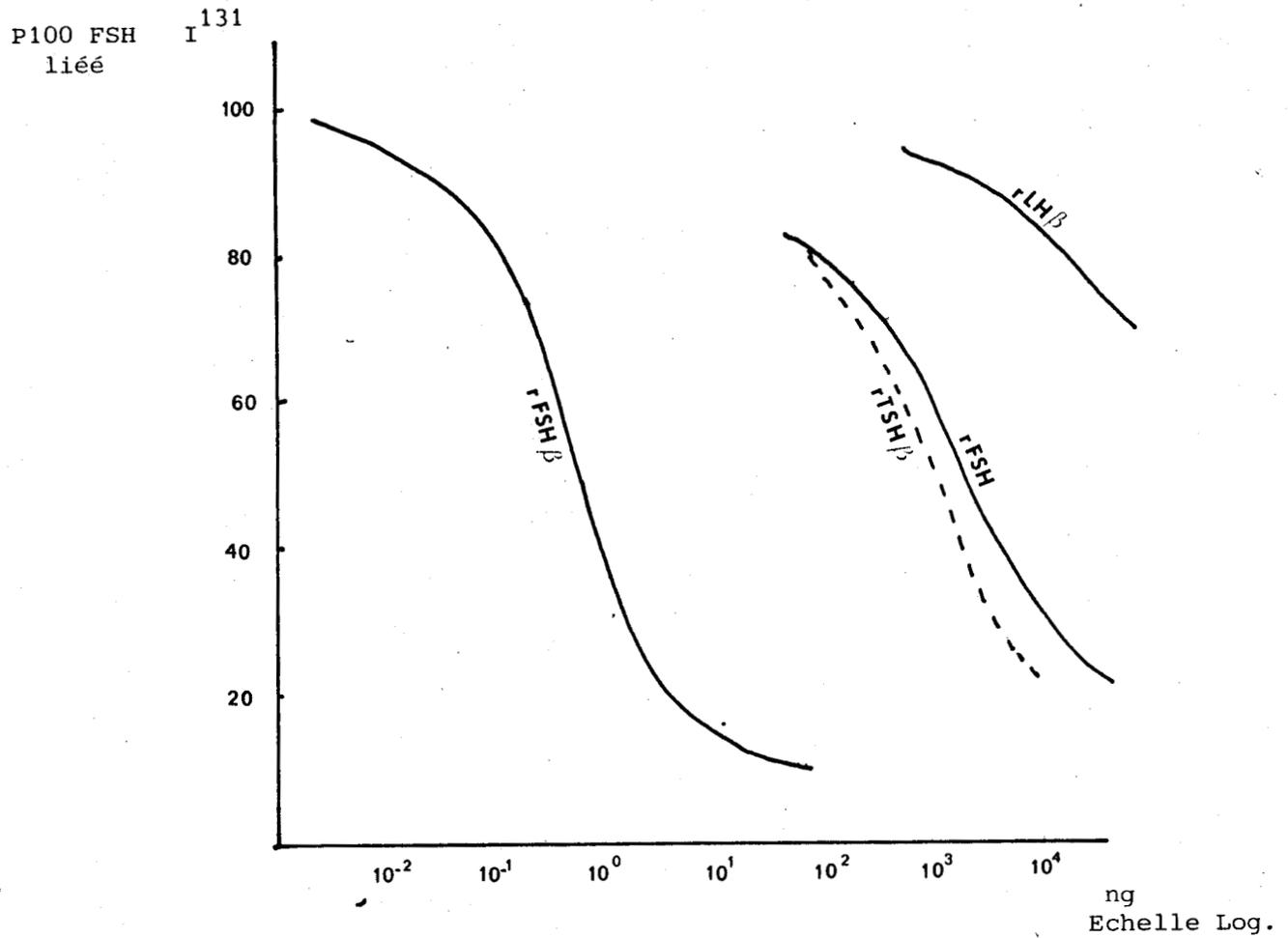


FIG. 4

Déplacement de la rFSH  $\beta$  marquée fixée aux anticorps anti rFSH  $\beta$  par la rFSH  $\beta$ , rTSH  $\beta$ , rFSH, rLH  $\beta$  non marqués (en système radioimmunologique).

## Tests immunocytologiques:

Antigènes Anticorps	LH ovine	LH $\alpha$ porcine	LH $\beta$ porcine	FSH ovine
Anti LH ovine	-	+	+	+
Anti LH $\beta$ porcine	-	+	-	+

Tableau II: Inhibition par les antigènes homologues et hétérologues des réactions d'immunofluorescence induites par les anti gonadotropines.

- Anti TSH

Il a été obtenu à partir de l'antigène du NIH (TSH-B2)

Tests sérologiques (Dubois M.P. 1971b): les tests les plus significatifs ont été la fixation quantitative du complément et l'inhibition de la fixation du complément (Fig. 5).

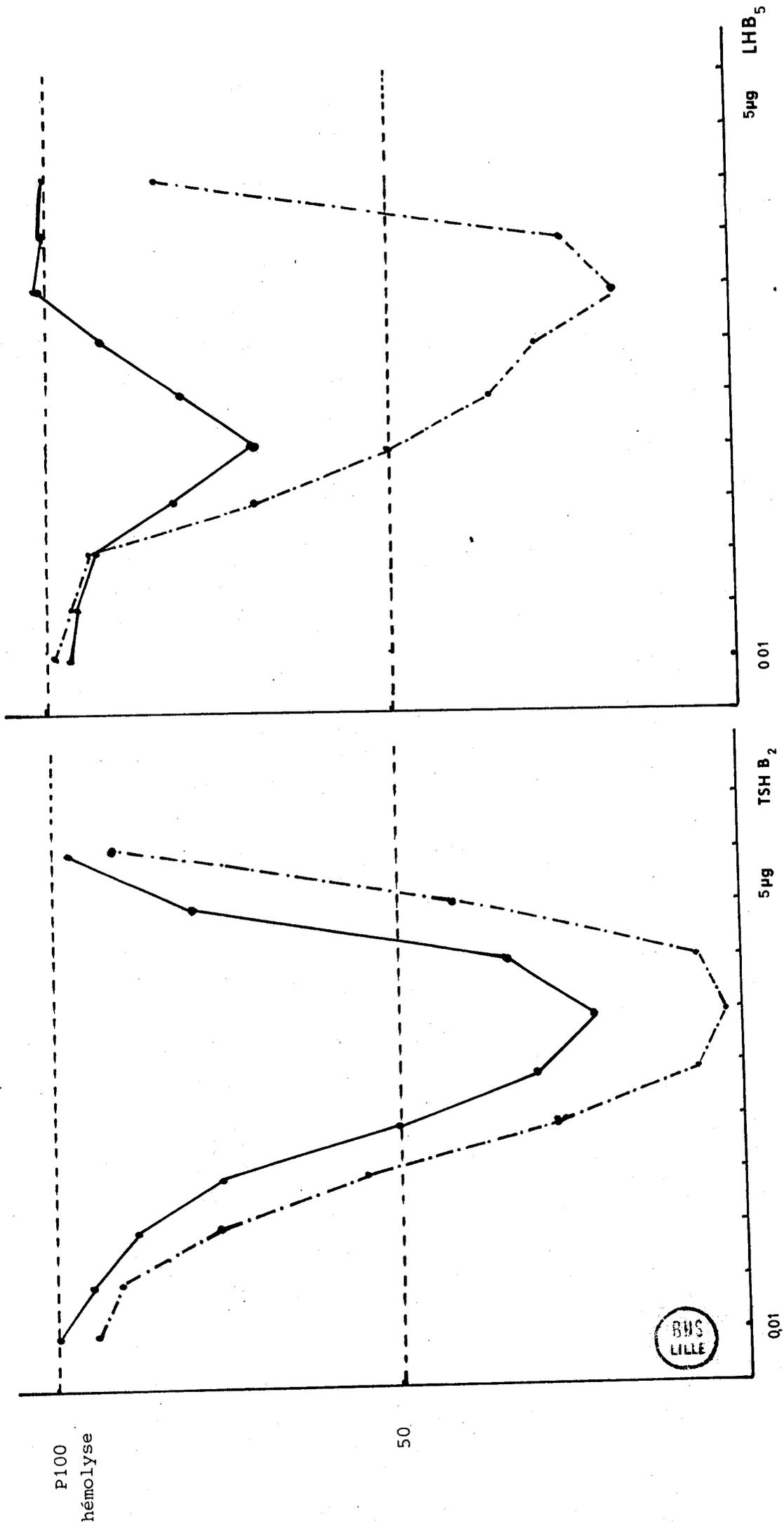
Elles indiquent que la TSH-B2 contient un contaminant LH important responsable de la fraction anticorps dirigé contre LH dans l'anticorps anti TSH.

Par ailleurs LH et FSH sont inhibitrices de la fixation du complément en présence du couple (Ac anti TSH(saturé)-TSH).

L'anticorps anti TSH doit donc être saturé par des protéines sériques et par une quantité de LH déterminée à partir des réactions d'inhibition de fixation du complément.

Test immunocytologique: Après saturation par les protéines sériques et la LH-B5, la TSH bovine (NIH-B2) inhibe totalement la fluorescence à la concentration de 0,125 mg par ml d'anticorps saturé.

Les autres antigènes n'ont pas d'effet inhibiteur.



BMS  
LILLE

— Anti TSH saturé par les protéines sériques  
-.- Anti TSH brut

FIG. 5 Fixation du complément en présence de l'anticorps anti TSH bovins et de TSH et LH bovine

- Anticorps anti.somatotropine et anti.prolactine

Tests cytologiques: Dans le cas des cellules acidophiles bien connues et bien individualisées par les techniques de colorations signalétiques et histochimiques, il a été considéré que si l'anticorps marquait le seul type cellulaire présumé contenir l'antigène, celui-ci était suffisamment spécifique (Beck et Currie 1967). D'éventuels anticorps contaminants ont cependant été recherchés par fixation du complément (Dubois 1971).

L'Anti prolactine de Rat a été fabriqué à partir de prolactine de Rat isolée à l'I.N.R.A.

L'Anti prolactine ovine a été préparée par le Docteur Gabrion (Faculté de Médecine - Montpellier).

L'Anti somatotropine humaine a été préparée à partir de STH humaine (Kabi. - Stockholm).

C-Description de la technique permettant l'individualisation des types cellulaires par superposition d'observations de microscopie photonique et électronique.

1- Principe

Nous avons recherché une technique pouvant à la fois permettre une mise en évidence spécifique des sites antigéniques tout en gardant la possibilité d'observer les tissus préparés classiquement pour la microscopie électronique.

Ceci a été possible en réalisant une réaction immunocytochimique sur des coupes semi-fines visibles en microscopie photonique et en observant à l'échelle ultrastructurale la coupe ultrafine rigoureusement adjacente.

Cette technique promettait d'être intéressante à la condition d'obtenir des réactions immunologiques sur des tissus fixés puis post-fixés au tétroxyde d'osmium.

La mise au point de cette méthode a été réalisée en collaboration avec Tramu.

## 2- Description de la technique

### a-Coupes

Après avoir été fixés, post-fixés puis inclus, les tissus sont coupés à l'aide d'un ultramicrotome Porter Blum MT1. La condition essentielle pour obtenir de bons résultats avec cette technique est de recueillir les coupes ultrafines sur grilles rigoureusement adjacentes aux coupes semi-fines collées sur lames.

Il est indispensable de fabriquer d'abord les coupes ultrafines puis les coupes semi-fines.

Deux coupes semi-fines sont généralement utilisées, l'une pour la réaction immunocytochimique, l'autre soit pour des colorations, soit pour mettre en évidence un autre antigène.

Les coupes semi-fines ne doivent être ni trop fines, car l'observation devient impossible, ni trop épaisses, car on provoque alors des déchirures. L'épaisseur moyenne se situe aux environs de  $1,5\mu$ .

### b - Traitement des coupes semi-fines

Les coupes semi-fines sont débarrassées de l'araldite selon la méthode décrite par Mayor et coll (1961) au méthoxyde de sodium dilué au tiers pendant 3 mn. Après passages dans un mélange alcool-benzène puis dans de l'acétone, elles sont rincées à l'eau distillée. Elles subissent alors une oxydation dans de l'eau oxygénée à 10p100 pendant 10 à 20 mn.

Cette oxydation est indispensable pour obtenir des résultats immunocytochimiques positifs, mais le temps d'oxydation, dès que l'on dépasse 10 mn, ne semble plus avoir beaucoup d'importance avec les immunsérums marqués à la peroxydase. Par contre, lorsque nous utilisons des immunsérums couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine, elle semble conditionner la présence ou l'absence d'un fond légèrement fluorescent.

Pour l'étude des cellules gonadotropes du Lérot, nous avons constaté qu'une oxydation à l'eau oxygénée à 10 p 100 pendant 3 mn suivie d'une oxydation à l'acide periodique à 10 p 100 pendant 10 mn pouvait améliorer la réaction et éviter ce fond fluorescent.

Les lames destinées aux techniques immunocytochimiques sont alors plongées dans du tampon phosphate pH: 7,2 pendant une nuit. Celles destinées aux colorations sont plongées dans l'eau distillée.

#### c- La réaction immunocytochimique

Elle se fait sur la coupe semi-fine adjacente à la coupe ultrafine. Nous avons utilisé la méthode indirecte préconisée par Coons, car la méthode directe consomme des quantités importantes d'anticorps qui doivent être utilisés non dilués. Par ailleurs cette technique évite de pratiquer un couplage anticorps-marqueur pour chacun des cas.

Elle se pratique en deux temps (Fig. 6)

-1er temps: anticorps spécifiques (AC1)

Les sérums sont employés à des dilutions variables. Le plus souvent ils ont été utilisés au 1/40<sup>e</sup> pendant 30 à 40 mn à 20°C.

-2ème temps: anti-gamma-globulines marquées (AC2)

On utilise des anti-gamma-globulines marquées dirigées contre les gamma-globulines anticorps de même espèce animale que celle qui a fourni le serum utilisé dans le premier temps de la réaction.

Dans tous les cas nous avons utilisé des gamma-globulines de Mouton anti-immunoglobulines de Lapin soit conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine, soit à la péroxydase (Institut Pasteur).

Le temps d'incubation a été de 30 à 45 mn à 20°C.

Lorsque nous utilisons l'isothiocyanate de fluorescéine comme marqueur, les coupes sont contre colorées au bleu Evans au 1/1000<sup>e</sup> pendant 5 à 10 mn et montées à la glycérine tamponnée.

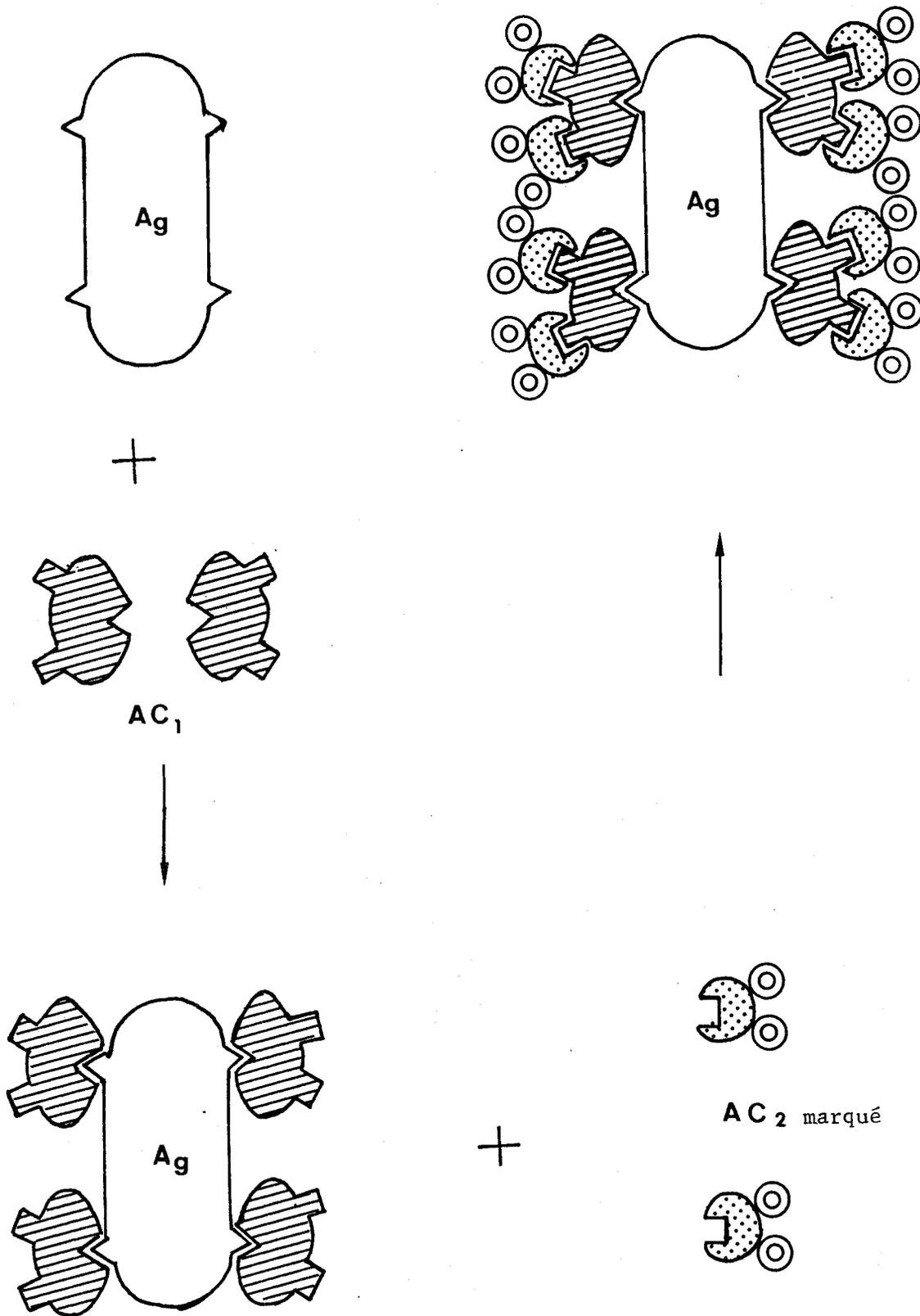


Fig.6: Schematisation de la technique immunohistochimique indirecte (selon Goldman)



Lorsque nous utilisons la peroxydase, sa mise en évidence se fait selon la technique de Graham et Karnovsky avec de la 3-3' diamino benzidine 4 HCl et de l'eau oxygénée: soit

- 5 mg de D.A.B. dans 10 cc de tampon TRIS
- 0,1 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3 p 100

La durée de révélation est de l'ordre de la minute. Un temps plus long amène souvent un fond brun non souhaitable.

La dilution des sérums a été effectuée pour cette technique dans du tampon phosphate salin. Sa composition est la suivante:

- 1 litre d'eau distillée
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre 1,07g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O 0,39g
- NaCl 8,5g

#### d- Coloration des coupes semi-fines

La technique d'immunofluorescence oblige à effectuer des colorations signalétiques sur la deuxième coupe adjacente afin d'observer des éléments de repérage, notamment des capillaires facilitant la superposition avec la microscopie électronique.

Ces colorations effectuées par Tramu, ont généralement été le tétrachrome de Herlant.

#### e- Traitement de la coupe ultrafine

Les coupes ultrafines sont contrastées au citrate de plomb selon la technique de Venable et Coggeshal (1963)

### 3- Superpositions

#### a- Immunofluorescence- microscopie électronique

La superposition se fait par l'intermédiaire d'une coupe colorée au tétrachrome de Herlant.

Le principe essentiel pour superposer des images obtenues en microscopie photonique et électronique est de repérer un champ au microscope électronique et de le retrouver sur la coupe semi-fine adjacente observée en microscopie photonique. L'inverse est beaucoup plus problématique.

D'un point de vue pratique, nous avons en général photographié un carreau entier d'une grille à des grossissements de 3 000 puis nous avons effectué les montages des microphotographies. Il faut en général avoir de bons repères: ce sont le plus souvent des capillaires ayant une forme particulière qui sont alors facilement reconnaissables sur la coupe semi-fine colorée.

Dans un deuxième temps, on superpose les coupes semi-fines colorées et les coupes semi-fines ayant subi la réaction d'immunofluorescence.

#### b- Immunoperoxydase- Microscopie électronique

La superposition est beaucoup plus facile car les contours des cellules non réactives ainsi que les capillaires sont bien visibles. En regardant simultanément en microscopies photonique et électronique, il est possible de faire immédiatement les superpositions.

La deuxième coupe semi-fine peut alors être utilisée pour la mise en évidence d'un autre antigène lorsqu'il y a risque de réactions croisées ( anti LH et anti TSH par exemple).

#### 4- Avantages et inconvénients de la technique de superposition

Le fait que nous procédions à une fixation et à une post fixation osmique permet d'obtenir une bonne conservation des tissus. Par ailleurs les coupes ultrafines sont colorées classiquement pour la microscopie électronique. Cette technique permet ainsi d'observer d'une manière très précise les différents types cellulaires et de voir tous les organites de la cellule.

Par contre elle présente essentiellement deux inconvénients:

- Il faut parfois beaucoup de temps pour arriver à avoir de bonnes correspondances entre les images de microscopies photonique et électronique.
- Elle ne renseigne que très peu sur la localisation intracellulaire des hormones.

#### D/ Technique immunocytoenzymologique sur coupe ultrafine

##### 1- But de la technique

Cette technique a été utilisée dans le but d'étudier la localisation intracellulaire des hormones.

##### 2- Principe

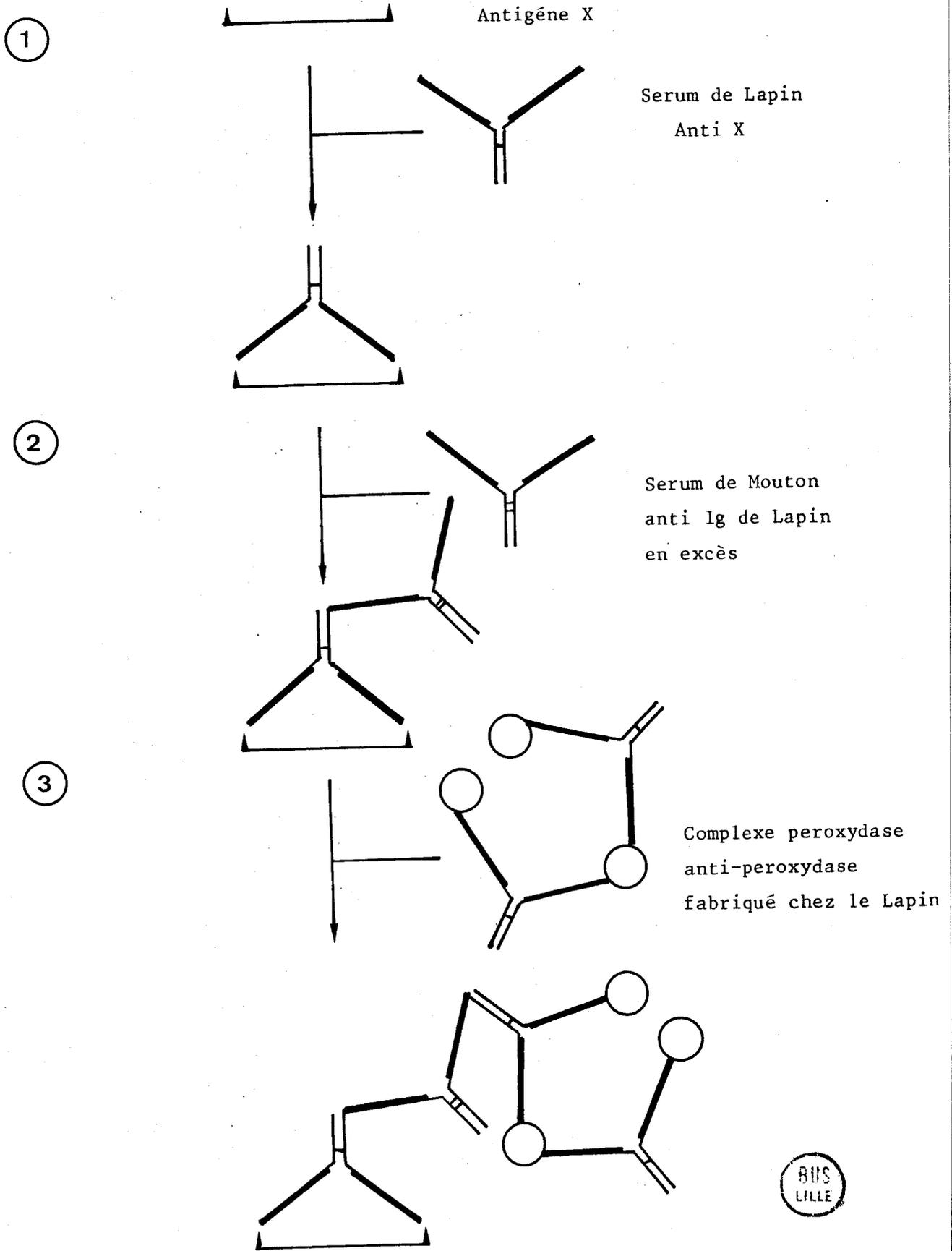
Cette méthode a été décrite par Moriarty et Halmi (1972) et son originalité réside dans le fait d'utiliser le complexe peroxydase-anti-peroxydase de Sternberger (1970).

Les tissus sont fixés, inclus, puis débités en coupes ultrafines. Celles-ci sont recueillies sur des grilles en or ou en nickel où elles peuvent subir directement la réaction immunocytochimique.

La technique utilisée est l'application stricte de celle clairement décrite par Petrali et coll (1974) dont les temps sont les suivants:

- 20 minutes d'eau oxygénée à 10 p 100
- Rinçage H<sub>2</sub>O distillée
- Serum de mouton normal au 1/30<sup>e</sup> - 5 mn
- Anticorps spécifique à des concentrations variables allant du 1/40<sup>e</sup> à 1/1000<sup>e</sup> selon les anticorps (de 5 mn à la température ambiante à 48 heures à 4°C.)

Fig. 7: Schématisation de la réaction immunocytochimique utilisant le P.A.P. (selon Sternberger)



- Rinçage dans le tampon avec 1/100 de serum de mouton normal
  - Serum de mouton au 1/30è - 5 mn
  - Rinçage dans le tampon (+ 1/100è de serum de mouton normal).
  - Serum de mouton anti-lapin au 1/15è ou au 1/20è - 5 mn
  - Rinçage dans le tampon (+ 1/100è de serum de mouton normal).
  - Serum de mouton normal au 1/30è - 5 mn
  - Rinçage dans le tampon (+ 1/100è de serum de mouton normal).
  - Complexe peroxydase-anti-peroxydase dilué selon les lots au 1/50è ou au 1/100è - 5 mn
    - Rinçage dans le tampon TRIS salin.
    - Diaminobenzidine 4 HCl ( 12,5 mg pour 100 cc de tampon TRIS non salin auquel on ajoute 0,1 ml d'H2O2 à 3 p 100) - 3 mn sous agitation
    - 2 rinçages dans l'eau
    - Tetroxyde d'osmium à 4 p 100 : 10 à 20 mn

Deux types de tampon ont été employés: le tampon phosphate salin ( pH: 7,2) et le tampon TRIS salin 0,05M (pH: 7,6)

Dans certains cas le tampon phosphate salin a été utilisé pour la dilution de tous les serums sauf pour le P.A.P. qui a toujours été dilué dans le tampon TRIS salin.

Dans d'autres cas, seul l'anticorps spécifique a été dilué dans le tampon phosphate salin alors que les autres serums ont été dilués dans le tampon TRIS salin.

### 3- Avantages et inconvénients

Cette technique permet une localisation directe des sites antigéniques avec une consommation très faible d'anticorps.

Par ailleurs elle est plus sensible que les autres techniques (Petralli et coll 1974).

Elle peut ainsi être utilisée pour étudier le mode de formation des granulations.

Par contre la caractérisation précise de la cellule s'avère difficile car le fond cytoplasmique et les organites cellulaires non marqués sont peu visibles.

#### E - Technique immunocytochimique sur coupes à congélation

Le but de cette technique a été également d'étudier la localisation intracellulaire des hormones hypophysaires.

Cette méthode a été utilisée uniquement sur des adénohypophyses de Cobaye.

La manipulation employée est celle décrite par Mazzuca et Dubois M.P. (1974) et correspond à des modifications de celle de Nakane (1970).

Les hypophyses ont toujours été fixées dans du P.A.F. Elles sont ensuite rincées dans du tampon phosphate pendant une nuit. Après une heure d'imprégnation avec du glycérol à 10 p 100 les tissus sont congelés dans de l'azote liquide à basse pression.

Des coupes d'environ 20 $\mu$  d'épaisseur sont alors effectuées au cryostat. Elles sont ensuite passées dans différents bains.

Pour les dilutions et les rinçages le tampon utilisé a toujours été le tampon phosphate salin pH: 7,2

#### 1- Mode opératoire

- Sérum de mouton au 1/30 $\bar{e}$ ; 10 mn
- Rinçage (avec 1 p 100 de sérum de mouton normal)
- Anticorps spécifique ( 1/40 $\bar{e}$ ); une heure à la température ambiante.

- 3 rinçages de 10 mn
- Fraction F.A.B. de mouton anti-lapin marquée à la peroxydase ( 1/80<sup>e</sup>).
- 3 rinçages de 10 mn
- 3-3' diaminobenzidine 4 HCl (selon Graham et Karnovsky) 3 mn.
- 2 rinçages à l'eau distillée de 10 mn
- Tetroxyde d'osmium à 4 p 100 pendant 20 mn
- 2 rinçages à l'eau distillée de 10 mn

Après cette réaction immunocytochimique les coupes sont alors déshydratées puis incluses dans de l'araldite.

Elles peuvent ensuite être recoupées à l'ultramicrotome et être observées au microscope électronique.

## 2- Avantages et inconvénients

L'avantage de cette technique est qu'elle permet de voir directement la localisation des sites antigéniques, notamment au niveau de l'ergastoplasme et de l'appareil de Golgi qui sont assez souvent visibles.

Les inconvénients sont de deux ordres:

- Premièrement les tissus sont parfois mal conservés à cause de la congélation; certains types cellulaires semblent d'ailleurs plus sensibles que d'autres.
- Deuxièmement la pénétration des anticorps ne se fait pas toujours dans toute l'épaisseur de la coupe.

## F - Réactions générales de contrôle

Quelle que soit la technique utilisée, les contrôles procèdent du même principe:

- a/ omission de l'anticorps spécifique ou d'un élément

de la réaction, ou remplacement de l'anticorps spécifique par du sérum de lapin sain.

b/ Diamino benzidine (D.A.B.) seule ou D.A.B. et acide osmique seuls.

c/ Saturation de l'anticorps par adjonction en excès de l'antigène homologue.

Il ne nous a pas paru utile de rappeler ici les notions classiques concernant :

- les propriétés de la liaison anticorps-antigène
- les diverses réactions possibles (spécifiques, croisées, aspécifiques)
- les problèmes liés à la mono ou à la polyspécificité des immunogènes et des antisérums
- les problèmes liés à la pluralité éventuelle des formes moléculaires des antigènes spécifiques à l'issu des techniques histologiques préparatives.

Certains de ces points seront cependant évoqués dans les discussions des chapîtres suivants

LES CELLULES CORTICOTROPES

A/ Etat des connaissances concernant la structure fine  
de ce type cellulaire au début de nos travaux

L'identification des cellules corticotropes a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux à l'échelle de la microscopie photonique sans aboutir à un accord parfait entre les différents auteurs en ce qui concerne les affinités tinctoriales. Encore maintenant, alors que la majorité des chercheurs admettent que les cellules corticotropes sont basophiles et présentent une réaction P.A.S. positive, Yoshimura et coll (1974) affirment que les cellules corticotropes correspondent à des cellules à "petites granulations éosinophiles".

A l'échelle ultrastructurale, la première publication concernant les cellules corticotropes est due à Farquhar (1957) qui voit dans les cellules agranulaires de l'hypophyse du Rat la source de l'ACTH. Cette hypothèse semblait être confirmée par Rennels (1964) qui après des "stress importants" infligés à des Rats, observe les plus grosses modifications au niveau de l'hypophyse dans ces mêmes cellules agranulaires.

Cependant Siperstein et Allison (1965) puis Kurosumi et Kobayashi (1966) étudient des hypophyses de Rats surrénalectomisés et attribuent la fonction corticotrope à une cellule contenant des granulations sécrétoires.

Les travaux vont se poursuivre chez cette même espèce (Nakayama et coll, 1969; Siperstein et Miller, 1970; Pelletier, 1970; Pelletier et Racadot, 1971) et vont confirmer les premières déductions de Siperstein et Allison (1965).

L'étude des cellules corticotropes d'autres mammifères dans des conditions expérimentales est plus rare. Nous citerons Girod et coll, 1964 (hamster doré); Yamada et Yamashita, 1967 (souris)

Lenys et Bugnon, 1973 (Renard) qui individualisent un type cellulaire présumé à ACTH dont l'ultrastructure est assez semblable à celle du Rat.

A partir de tous ces travaux les caractéristiques ultrastructurales de la cellule corticotrope ont été établies:

-Ayant généralement une forme polyhédrique, elle envoie des prolongements entre les cellules voisines. Le noyau, souvent excentré, présente des formes irrégulières.

-Les granulations ont un diamètre de 1500 à 2000 Å environ et le contenu dense aux électrons se détache nettement de la membrane qui l'entoure. Elles sont préférentiellement situées en périphérie de la cellule. Des granulations dites immatures de plus grande taille sont observées près de l'appareil de Golgi qui est constitué d'un ensemble de petits dictyosomes.

-L'ergastoplasme est assez peu développé chez le Rat mais semble plus abondant chez le Renard (Bugnon et coll 1973).

#### B/Etat des travaux de nature immunohistochimique en microscopie photonique

C'est Marshall en 1951 qui fut le premier à appliquer les techniques d'immunofluorescence afin de mettre en évidence les cellules corticotropes dans l'hypophyse du Porc et des bovins. La spécificité des anticorps fut cependant très contestée.

La préparation d'anticorps contre les polypeptides synthétiques a apporté de nombreuses améliorations quant à la pureté des sérums.

L'anticorps le plus utilisé et pratiquement le seul jusqu'en 1970 était celui dirigé contre la partie 1-24 de la molécule d'ACTH: l'anti  $\beta$ -1-24 ACTH

De nombreux travaux ont ainsi été effectués sur l'adénohypophyse du Rat (Hachmeister et Kracht, 1965; Kracht et coll, 1965; Shiino, 1967; Breustedt, 1968; Hess et coll, 1968; Herlant et coll, 1972; Bowie et coll, 1973; Dubois M.P., 1973) aussi chez le Lapin et le Chat (Hachmeister et Kracht, 1965), chez le Hamster (Herlant et coll, 1972; Girod et Dubois M.P.- 1974;

chez les bovins (Dubois M.P., 1971a, 1972a, 1972b, 1973; Herlant et coll, 1972); chez les ovins (Dubois M.P., 1971a, 1972a, 1972b, 1973); chez les porcins (Hachmeister et Kracht, 1965; Dubois M.P., 1971a, 1972b, 1973; Herlant et coll, 1972); chez l'Homme (Kracht et coll, 1965, 1966; Hachmeister et Kracht, 1965; Bozman, 1967).

A partir de 1970 et en même temps que commence à apparaître l'utilisation de la peroxydase comme marqueur, est employé un autre anticorps dirigé contre la partie 17-39 de la molécule d'ACTH: l'anti $\alpha$ -17-39 ACTH.

De nombreux travaux sont alors repris avec cet anticorps qui, selon beaucoup d'auteurs, est plus spécifique que l'anti  $\beta$ -1-24 ACTH (on élimine le problème de la réaction croisée avec l'anti  $\beta$  MSH).

De nouveaux résultats sont ainsi obtenus chez le Rat (Baker, 1972; Baker et Drummond, 1972; Kraicer et coll, 1973); chez les bovins (Phifer et Spicer, 1970); chez les porcins (Phifer et Spicer, 1970); chez l'Homme (Phifer et Orth, 1970).

Notons enfin que quelques travaux ont été effectués en utilisant de l'anti ACTH naturelle, essentiellement d'origine porcine et humaine (Gersten et Baker, 1970; Takor Takor et Pearse, 1973).

Une revue exhaustive des publications concernant l'utilisation d'anticorticotropines a été effectuée par Girod (1976).

Baker (1974) a comparé les cellules marquées par l'anti ACTH porcine, l'anti  $\beta$ -1-24 ACTH et l'anti $\alpha$ -17-39 ACTH et il constate que ce sont les mêmes cellules qui sont immunologiquement réactives.

Ces techniques ont permis à la majorité des auteurs d'admettre que les cellules corticotropes correspondent bien aux cellules basophiles P.A.S. positives (Baker, 1970; Dubois M.P., 1971 ).

Elles ont montré que contrairement à ce qu'avait pu suggérer Dhom (1963), les cellules corticotropes et les cellules thyroïdiques sont deux types cellulaires distincts.

C/ Résultats obtenus par l'application des techniques immunocytochimiques à la microscopie électronique

Les premiers travaux d'observation des cellules corticotropes à l'échelle ultrastructurale par des techniques immunocytochimiques sont dûs à Nakane (1970).

Celui-ci fixe ses tissus dans du P.A.F., les congèle, les coupe au cryostat et procède ensuite aux réactions immunologiques (utilisation de l'anti ACTH porcine). Le matériel est ensuite réinclus dans de l'épon et recoupé pour l'observation au microscope électronique.

Les résultats apparaissent en fait assez décevants et il est difficile de dire si le type cellulaire individualisé correspond bien aux cellules décrites par Siperstein et Allison (1965), Kurosumi et Kobayashi (1966), Pelletier (1970), Pelletier et Racadot (1971).

En 1972, un essai de comparaison de coupes ultrafines et de coupes semi-fines traitées avec de l'anti  $\beta$ -1-24 ACTH est effectué par Bowie (1972), Bowie et coll (1973) en utilisant le méthacrylate comme milieu d'inclusion. Là encore, la préservation des tissus n'est pas excellente mais les cellules observées ressemblent aux cellules individualisées par Siperstein et Allison (1965).

En 1972 apparaissent les premiers travaux de Moriarty et Halmi qui utilisent la technique au P.A.P. sur coupes ultrafines. Le marquage est spectaculaire et les granulations apparaissent très fortement colorées. Les cellules sont de petite taille, anguleuses, et envoient des prolongements entre les cellules voisines. Les granulations ont un diamètre moyen de 2200 Å et sont souvent alignées en périphérie de la cellule.

Tous ces critères correspondent à ceux donnés par Siperstein et Allison (1965) concernant les cellules corticotropes.

L'inconvénient reste cependant que le fond cytoplasmique et les organites cellulaires sont difficilement discernables.

Lorsque notre travail a débuté, seules les cellules corticotropes du Rat avaient fait l'objet des travaux précités. Aucune étude n'avait été effectuée chez d'autres mammifères.

#### D/ Données récentes sur les cellules corticotropes

Au moment où nos recherches ont commencé, le schéma habituellement admis était qu'il existait des cellules élaboratrices de MSH distinctes des cellules élaboratrices d'ACTH.

La  $\beta$  LPH, hormone découverte par Birket Li en 1964, constituée de 90 acides aminés, dont l'heptapeptide commun à la  $\beta$  MSH et à l'ACTH, avait fait l'objet de peu de travaux mais elle était considérée comme précurseur de la MSH.

Par ailleurs les superpositions des résultats obtenus avec l'anti- $\beta$  MSH et l'anti  $\beta$ -1-24 ACTH pouvaient être attribuées à une réaction croisée entre ces deux hormones.

A partir de 1972 ont été publiés différents travaux modifiant cette conception simple des cellules corticotropes et mélanotropes.

1er: Dubois (1972), Moon et coll (1973), Dessy et Herlant (1974) mettent en évidence de manière certaine que la  $\beta$  MSH, la  $\beta$  LPH et l'ACTH sont situées dans les mêmes cellules du lobe antérieur.

2ème: Cox et coll (1975) isolent dans l'hypophyse des bovins un peptide dont l'effet est analogue à la morphine (sur l'intestin de Cobaye par exemple) et dont l'effet est inhibé par un antagoniste spécifique de l'opium: la naloxone.

Hughes et coll (1975), Guillemin et coll (1976)

## E/ Recherches personnelles

### 1-Points particuliers sur les méthodes utilisées

Les trois méthodes décrites dans le chapitre "Matériel et Méthode" ont été utilisées pour l'étude de l'adénohypophyse du Cobaye. Pour celle du Léro, seules les méthodes de superposition et la technique au P.A.P. ont été employées.

#### Superposition;

- Fixateurs: - glutaraldéhyde-paraformaldéhyde suivi de tétroxyde d'osmium
- P.A.F. suivi de tétroxyde d'osmium
- P.A.F.
- Anticorps: - Anti  $\alpha$  17-39 ACTH au 1/80<sup>e</sup> - 45 mn
- Anti  $\beta$  1-24 ACTH au 1/40<sup>e</sup> - 45 mn
- Anti  $\beta$  MSH au 1/40<sup>e</sup> - 45 mn
- Anti  $\beta$  LPH au 1/40<sup>e</sup> - 1 h ) Cobaye
- Anti  $\beta$  endorphine au 1/40<sup>e</sup> - 1h ) seul

#### Technique sur coupe ultrafine:

- Fixateurs: - glutaraldéhyde )
- glutaraldéhyde-paraformaldéhyde ) Léro
- suivi de tétroxyde d'osmium )
- P.A.F.: Cobaye
- Anticorps: - Anti  $\beta$  1-24 ACTH au 1/40<sup>e</sup> 5 mn à 20°C: Léro
- Anti  $\alpha$  17-39 ACTH au 1/500<sup>e</sup> ) Cobaye
- 36 h à 4°C )

#### Technique à la congélation:

Seul l'anti  $\alpha$  17-39 ACTH au 1/80<sup>e</sup> a été utilisé.

2- Résultats

a/ Les cellules corticotropes du Lérot

$\alpha$  - Technique des superpositions

- Coupes semi-fines

Les résultats que nous avons obtenus sur les coupes semi-fines en fonction des différents anticorps et des différentes fixations sont résumés dans le tableau suivant:

Anticorps Fixateurs	Anti $\beta$ -1-24 ACTH	Anti $\alpha$ 17-39 ACTH	Anti $\beta$ MSH
Glutaraldéhyde + OsO <sub>4</sub>	+ + +	-	+ +
P.A.F. + OsO <sub>4</sub>	+ + +	-	+ +

Tableau III: Résultats immunohistochimiques obtenus avec les anticorticotropines selon le mode de fixation.

Les meilleurs marquages ont été obtenus avec l'anti  $\beta$ -1-24 ACTH. Les cellules présentant une réaction positive avec l'anti  $\beta$  MSH sont les mêmes.

L'intensité de l'immunofluorescence que nous avons pu observer sur des coupes semi-fines est absolument comparable à celle obtenue sur des coupes de 5  $\mu$  à la paraffine. La fluorescence, satisfaisante en intensité, est strictement limitée à des cellules souvent réunies en petites plages et réparties dans tout le parenchyme de l'antéhypophyse. Ces cellules n'ont ni une taille ni une forme particulières, ces critères ne peuvent être retenus pour leur reconnaissance.

Planche I

Superposition d'observations de coupes semi-fines et  
ultrafine (Lérot)

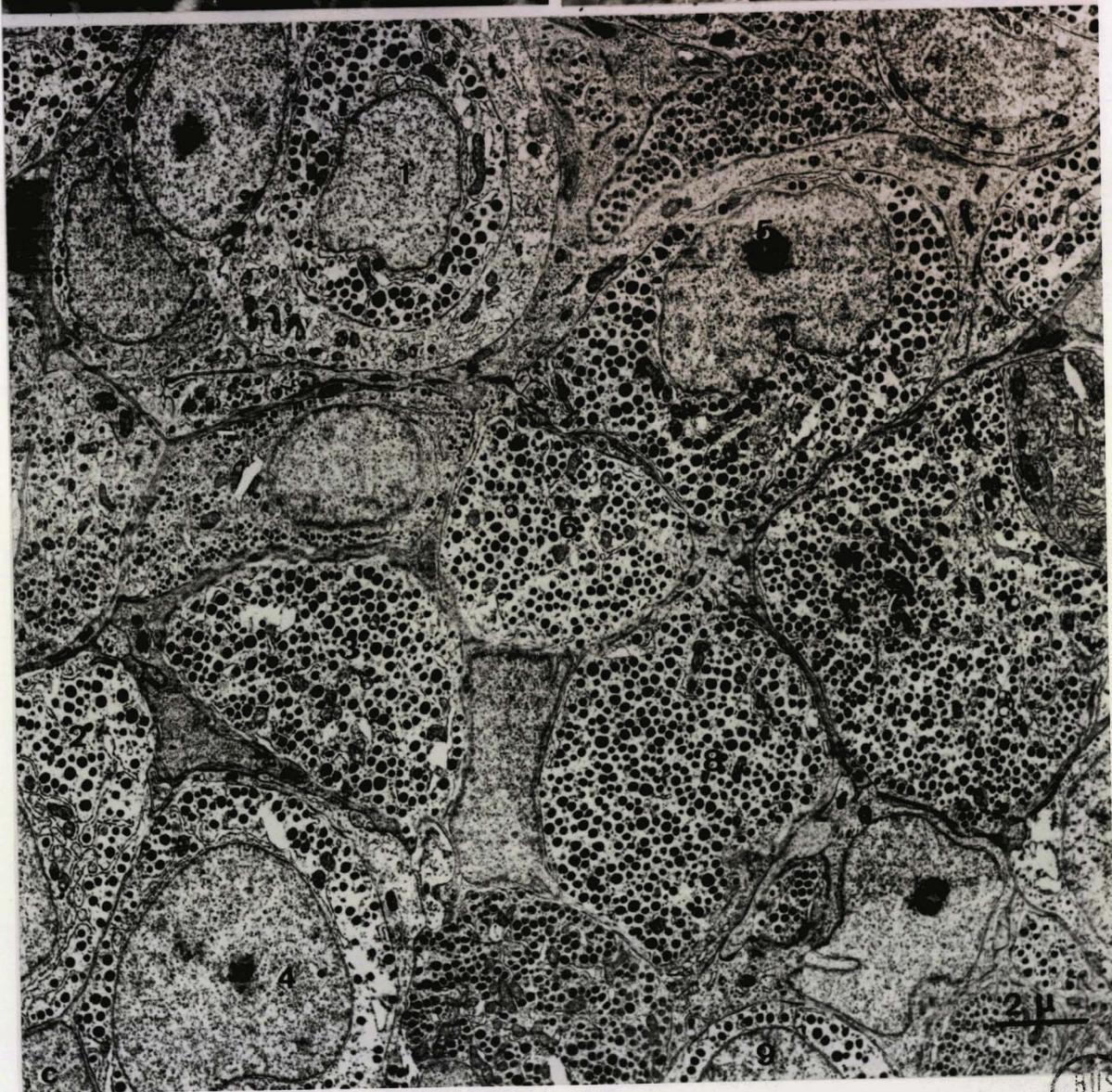
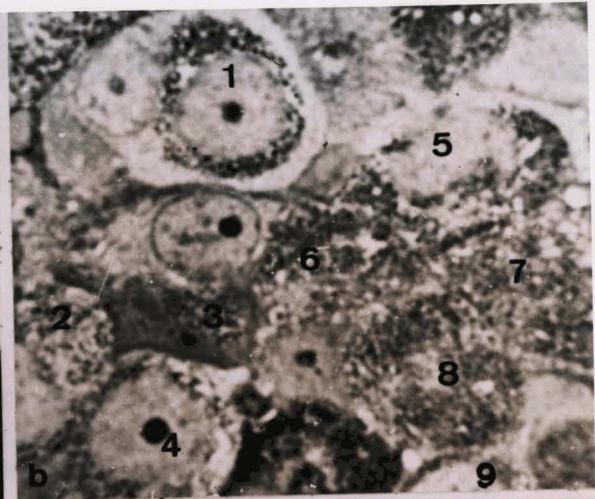
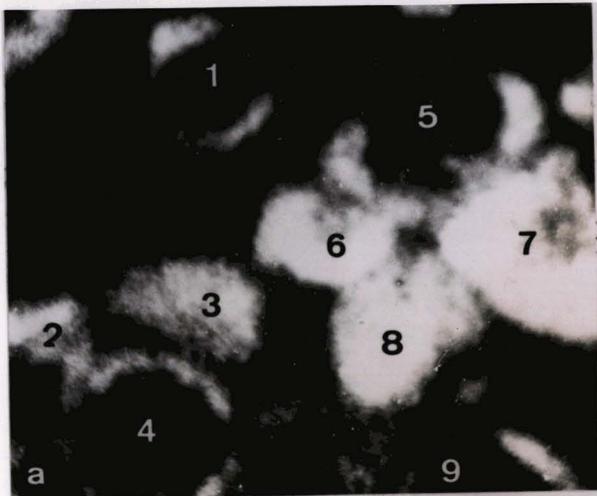
fig. 1a; Un groupe de cellules (1-9) est mis en évidence par  
une réaction d'immunofluorescence obtenue avec l'anti  $\beta$ -1-24 ACTH

fig. 1b; sur la coupe semi-fine adjacente les mêmes cellules  
sont retrouvées après une coloration par le tétrachrome de Herlant.

fig. 1c; ces cellules sont alors observées à l'échelle ultra-  
structurale sur la coupe ultrafine adjacente. On peut remarquer  
que toutes les cellules individualisées sont du même type.  
Pour faciliter la superposition, un montage de plusieurs micro-  
photographies est effectué.

G: x 6500





BUS  
LILLE

Planche II

Superposition d'observations de coupes semi-fines et  
ultrafine (Lérot)

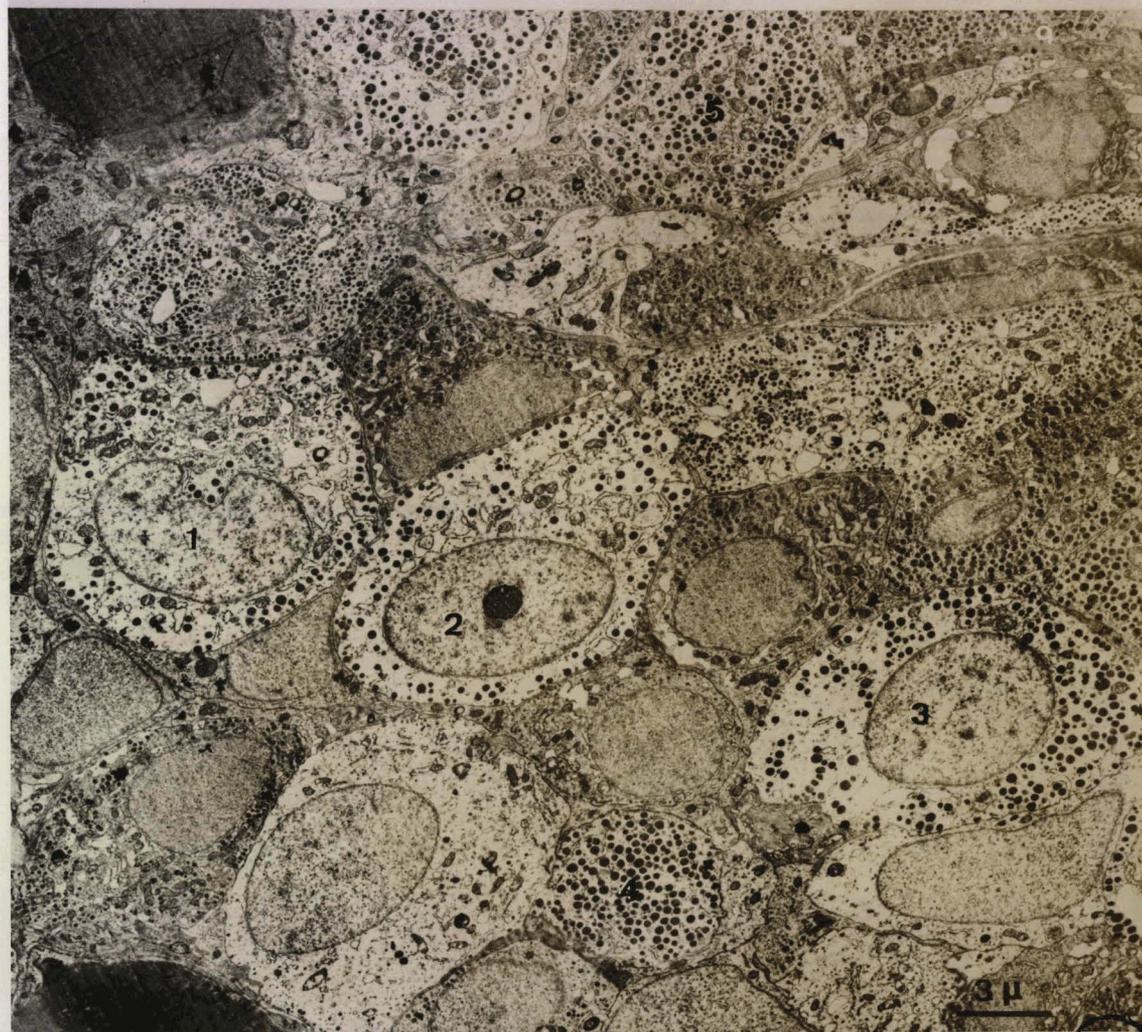
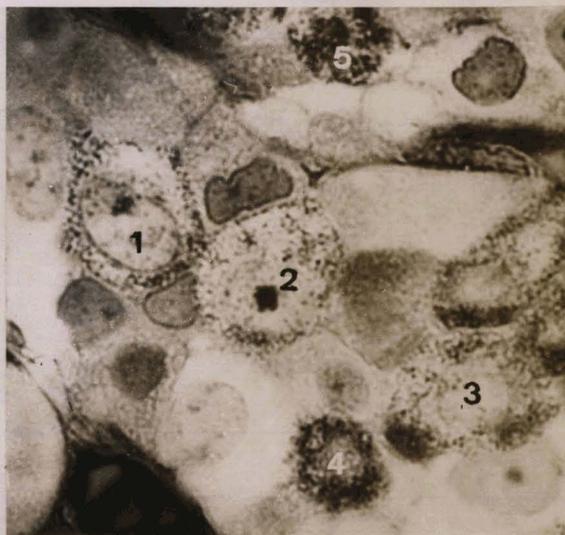
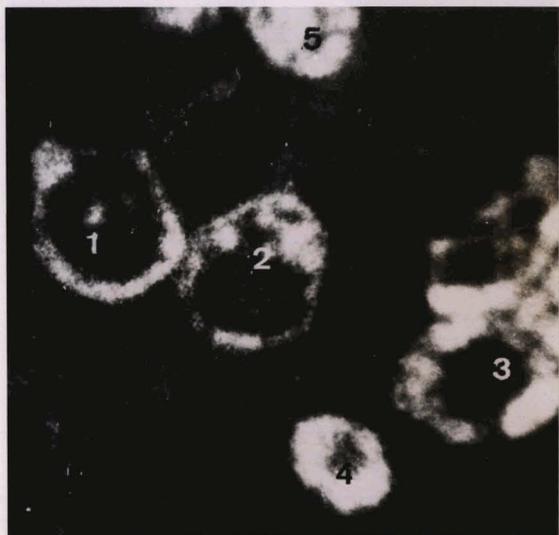
fig. a; Quatre cellules nettement marquées par l'anti  
β-1-24 ACTH. On remarque que la fluorescence n'intéresse que le  
cytoplasme.

fig. b; Le même champ après coloration par le tétrachrome  
de Herlant.

fig. c; Montage de quatre photographies correspondant aux  
cellules marquées. Elles sont caractérisées par un cytoplasme clair.  
Les granulations sont parfois situées en périphérie (cellule 1).  
On peut également remarquer que la petite tâche fluorescente de la  
cellule 1 observée sur la fig. a correspond en fait à quelques  
granulations.

G: x 4000





BUS  
LILLE

D'un point de vue quantitatif, elles sont très nombreuses dans le lobe antérieur. Les colorations effectuées sur la coupe semi-fine adjacente révèlent que ces cellules sont violettes après le tétrachrome de Herlant et qu'elles sont très nettement P.A.S. positives.

#### *- Coupes ultrafines*

Les champs examinés en fluorescence et après coloration sont retrouvés au microscope électronique et la correspondance cellule à cellule est établie.

Seules les réactions avec l'anti  $\beta$ -1-24 ACTH ont été utilisées pour les superpositions.

On constate immédiatement que toutes les cellules immunoréactives sont identiques, présentent les mêmes caractéristiques morphologiques et par conséquent appartiennent à un même type cellulaire. (Pl. I et II).

Le cytoplasme est clair et contient des granulations sécrétoires denses aux électrons. Ces cellules possèdent très souvent un fort rapport nucléoplasmatique. Le noyau est rond, parfois encoché. Lorsque la coupe passe par le nucléole, celui-ci est en général volumineux et central. Les saccules ergastoplasmiques sont peu nombreux et ont des directions variées. Le réticulum endoplasmique est très peu développé. La quantité de ribosomes libres est nettement inférieure à celle observée dans les autres types cellulaires.. Ceci explique en partie l'aspect clair caractéristique du cytoplasme. L'appareil de Golgi est souvent bien visible et on observe fréquemment des granules en voie de formation.

Les granulations sont de forme ronde ou parfois de forme polyhédrique. Elles peuvent être en nombre très variable à l'intérieur de la cellule. Lorsqu'elles sont nombreuses, elles se répartissent dans tout le cytoplasme. Par contre, lorsque leur nombre est plus réduit, elles semblent se situer préférentiellement à la périphérie, près de la membrane plasmique.

Planche III

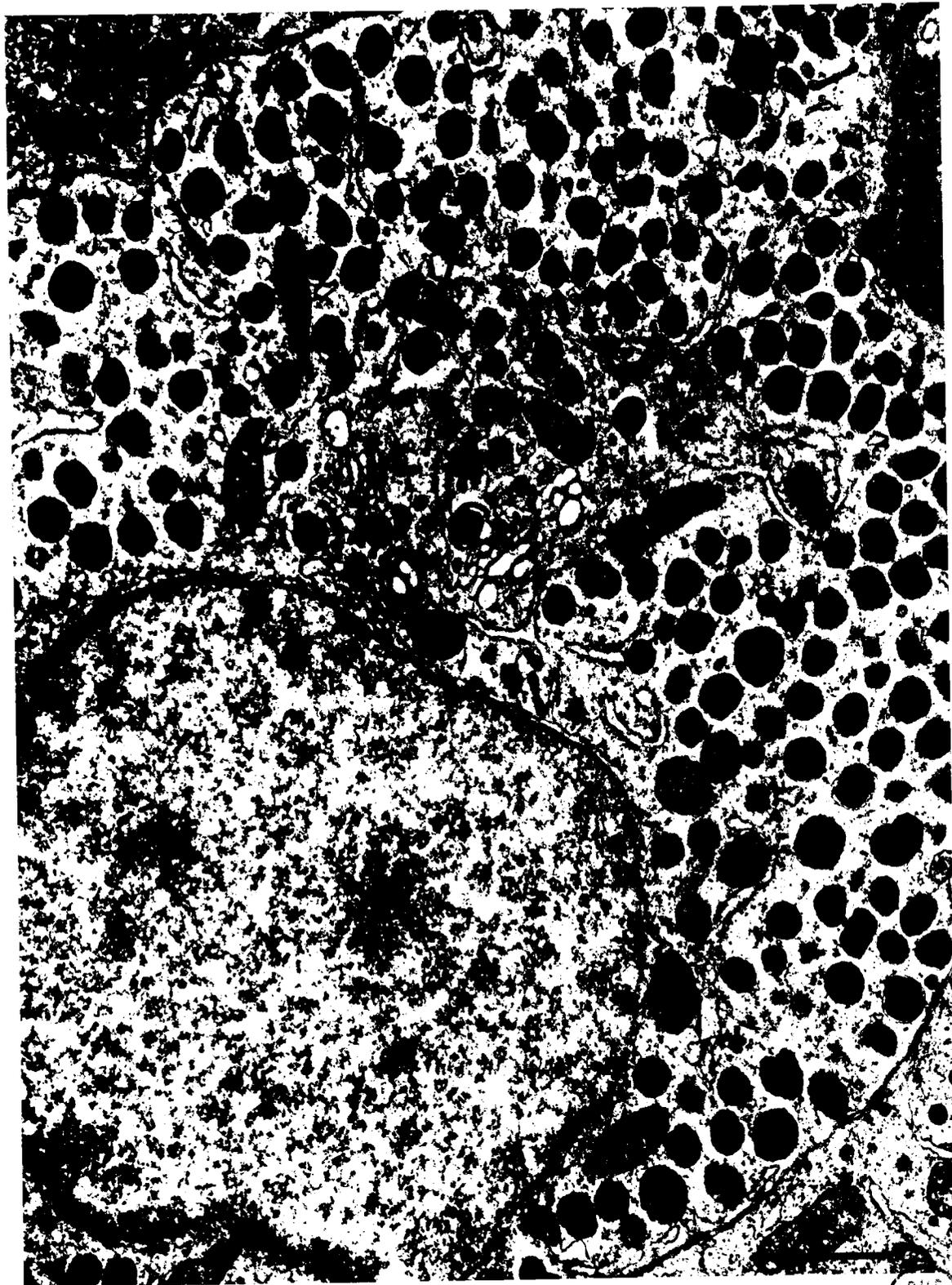
Aspect caractéristique d'une cellules corticotrope de Lérot

Les granulations ont une forte densité aux électrons, elles sont rondes ou polyédriques; il existe un espace clair entre le contenu et la membrane.

Le hyaloplasme est clair et l'ergastoplasme peu développé.

G: x 23000





BUS  
LICE

Leur diamètre se situe entre 2 500 et 3 500 Å mais nous avons pu observer des granulations de taille supérieure. A un grossissement élevé, il est possible d'observer un étroit espace clair entre la membrane et le contenu de ces granulations (Pl. III).

La forte densité des grains aux électrons et cet espace clair permettent de faire nettement la différence entre ce type cellulaire et un autre dont les granulations sont de même taille mais qui apparaissent moins denses aux électrons. De plus, elles ne présentent pas d'espace clair entre le contenu et la membrane.

Les mitochondries sont de forme et de taille très variables. De même, nous n'avons pas noté de points particuliers concernant les lysosomes et les dérivés lysosomiques.

L'observation simultanée des coupes semi-fines et des coupes ultrafines indique que pour les cellules corticotropes de Lérot, l'existence d'une réaction d'immunofluorescence est liée à la présence de granulations.

#### β -Technique immunocytochimique sur coupes ultrafines

Des résultats positifs ont été obtenus après des fixations au glutaraldéhyde seul et avec le glutaraldéhyde-paraformaldéhyde suivi d'une post fixation osmique (Pl. IV).

Dans les deux cas cependant nous n'avons pas pu obtenir de très bons résultats.

Seules les granulations apparaissent plus denses aux électrons et présentent un marquage bien visible. Celui-ci n'existe pas lorsque l'on remplace l'anti β-1-24 ACTH par du serum de Lapin sain.

Le nombre, la répartition, ainsi que la taille des granulations positives indiquent sans aucun doute que ces cellules sont les mêmes que celles individualisées par la technique précédente.

Planche IV

Cellules marquées avec l'anti  $\beta$ -1-24 ACTH (technique au PAP, Lérot)

Les granulations présentent une réaction positive (flèche) mais il existe de nombreux précipités dans le fond cytoplasmique rendant peu interprétable tout autre marquage.

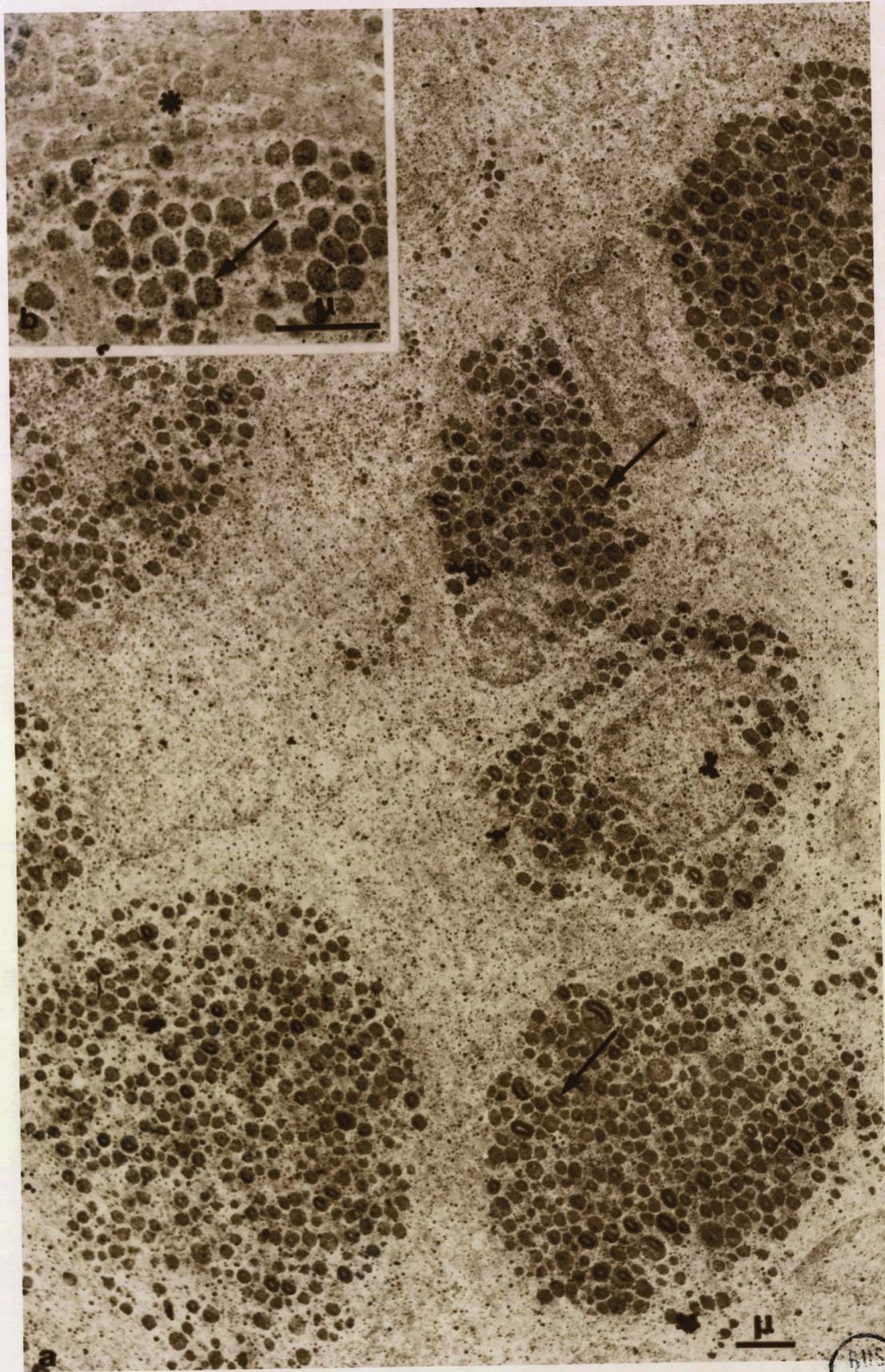
Il apparaît nettement que ces granulations sont les mêmes que celles observées dans les cellules individualisées par la technique de superposition.

Dans la fig. b, on peut distinguer l'aspect des granulations non marquées

fig. a; G: x 10000

fig. b: G: x 17000





Malheureusement les molécules de P.A.P. que nous pouvons observer dans tout le cytoplasme des cellules dont les granules sont positifs sont également présentes dans les autres types cellulaires. Il paraît alors impossible de tirer des conclusions de ce genre de précipité.

On constate également qu'il est très difficile de décrire les organites cellulaires avec ce type de technique. Dans le cas particulier, nous n'avons pu observer ni l'ergastoplasme, ni l'appareil de Golgi.

#### b/ Les cellules corticotropes du Cobaye

##### $\alpha$ - Technique de superposition

##### - Coupes semi-fines

L'étude a été effectuée en utilisant comme marqueur la peroxydase. Les résultats avec les différents anticorps et les différents fixateurs peuvent être résumés dans le tableau IV.

Il apparaît donc que c'est l'anti $\alpha$ -17-39 ACTH qui permet d'obtenir avec une fixation au P.A.F. suivie d'une post fixation osmique des réactions positives les meilleures (Pl. Va).

Là encore, l'intensité de ce marquage est absolument comparable à celle obtenue avec des coupes à la paraffine. Par contre, l'anti  $\beta$  LPH et l'anti  $\beta$  endorphine ne donnent des résultats que si la fixation n'est pas suivie d'une post-fixation osmique. Nous avons cependant pu constater que ces deux anticorps marquaient les mêmes cellules que l'anti $\alpha$ -17-39 ACTH.

Les cellules colorées en brun par la D.A.B. sont assez nombreuses et sont préférentiellement localisées dans la zone externe de la pars distalis ainsi que dans la région voisine de la pars intermedia.

Ces cellules sont très souvent groupées par trois ou quatre mais certaines d'entre elles sont également isolées au milieu d'autres types cellulaires. Elles présentent une forme irrégulière et leur taille est très variable.

TABLEAU N° IV

RESULTATS OBTENUS AVEC DIFFERENTS ANTI-HORMONES POLYPEPTIDIQUES  
SELON LE MODE DE FIXATION (COBAYE)

	Anti $\beta$ 1-24 ACTH	Anti $\alpha$ 17-39 ACTH	Anti $\beta$ MSH	Anti $\beta$ LPH	Anti $\beta$ endorphine
Glutaraldehyde Paraformaldehyde + OSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-
PAF + OSO <sub>4</sub>	-	+++	-	-	-
PAF	-	++	-	+	++

Planche V

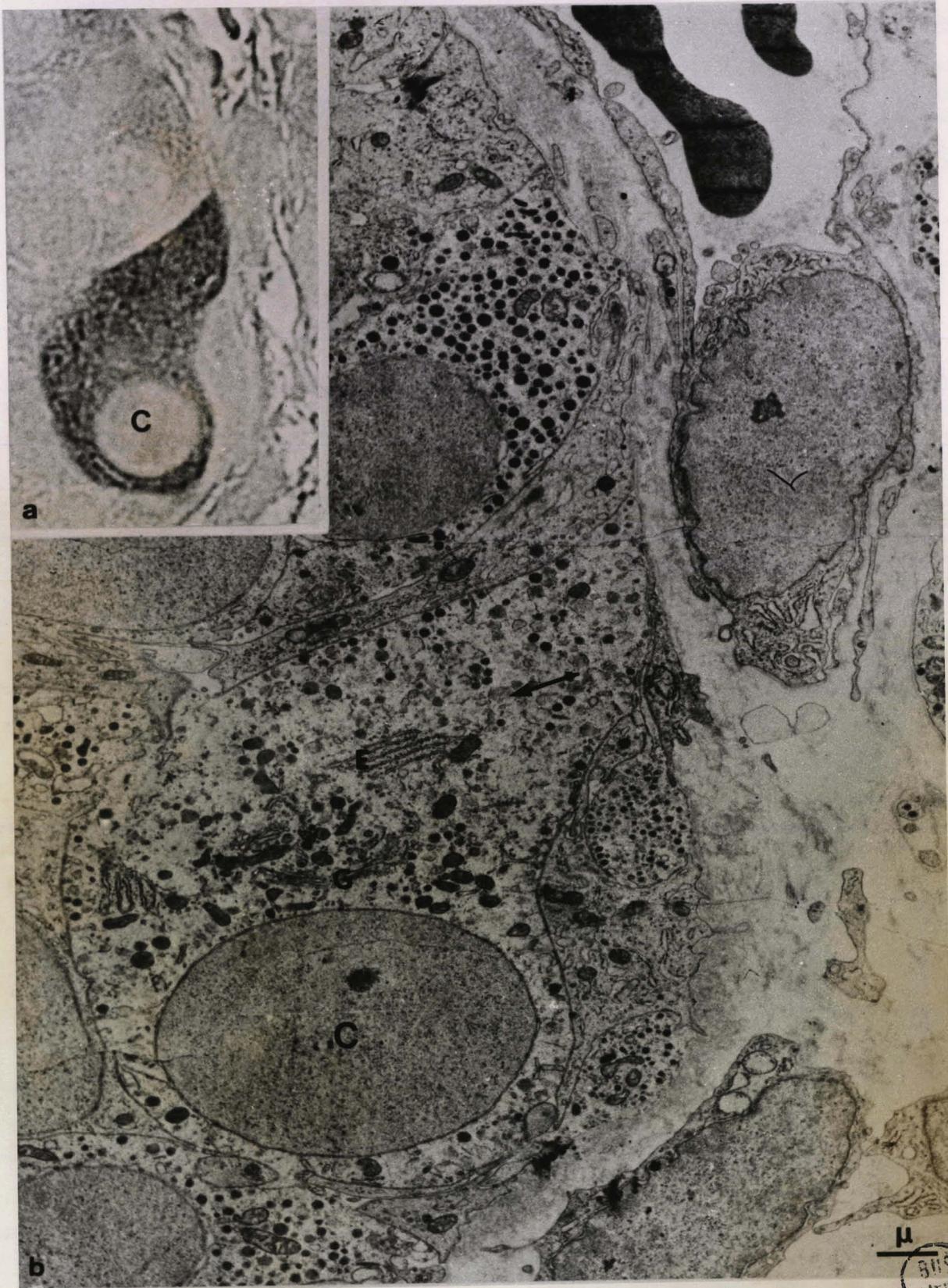
Superposition d'observations de coupes semi-fine et  
ultrafine (Cobaye)

fig. a; Une cellule est mise en évidence par une réaction  
immunocytochimique avec l'anti  $\alpha$ 17-39 ACTH.

fig. b; Cette même cellule est observée sur la coupe ultra-  
fine adjacente. A côté des petites granulations, la cellule  
contient des vésicules de plus grande taille. L'ergastoplasme se  
présente très souvent sous forme de petits empilements de saccules  
(E). L'appareil de Golgi est moyennement développé.

G: x10000





μ  
BIS  
LITE

A l'inverse de ce que nous avons pu constater chez le Lérot, le marquage observé sur les coupes semi-fines est localisé dans tout le cytoplasme des cellules présentant une réaction positive.

#### *- Coupes ultrafines*

La superposition précise des images obtenues en microscopies photonique et électronique est facilitée par l'emploi de la peroxydase comme marqueur. (Pl. V)

De même, dans le but d'obtenir des images de superposition plus démonstratives, nous avons choisi des cellules marquées non groupées et présentant des formes bien reconnaissables à la fois sur les coupes semi-fines et ultrafines.

Ces cellules ont une forme très irrégulière: elles sont souvent allongées et envoient des prolongements entre les cellules voisines.

Le noyau est de taille moyenne et le nucléole n'est pas très développé.

Le hyaloplasme est peu dense aux électrons mais il contient des ribosomes libres ou associés en polysomes qui donnent au cytoplasme un aspect un peu plus sombre.

Les granulations sont de petite taille, leur diamètre varie de 1 800 à 2 000 Å. Le contenu est très dense aux électrons et la membrane qui l'entoure apparaît bien visible à un fort grossissement. Le nombre de ces granulations n'est jamais très important. Une partie d'entre elles est située à la périphérie de la cellule près de la membrane plasmique.

Cependant à côté de ces granulations typiques existe un certain nombre de vésicules parfois vides ou à contenu moyennement dense aux électrons, dont la taille est nettement supérieure à celle des granulations. La membrane qui entoure ces densifications est parfois discontinue, donnant souvent l'impression que ces images sont le résultat d'une mauvaise fixation. (Pl. VI)

Planche VI

Fort grossissement d'une cellule corticotrope de Cobaye

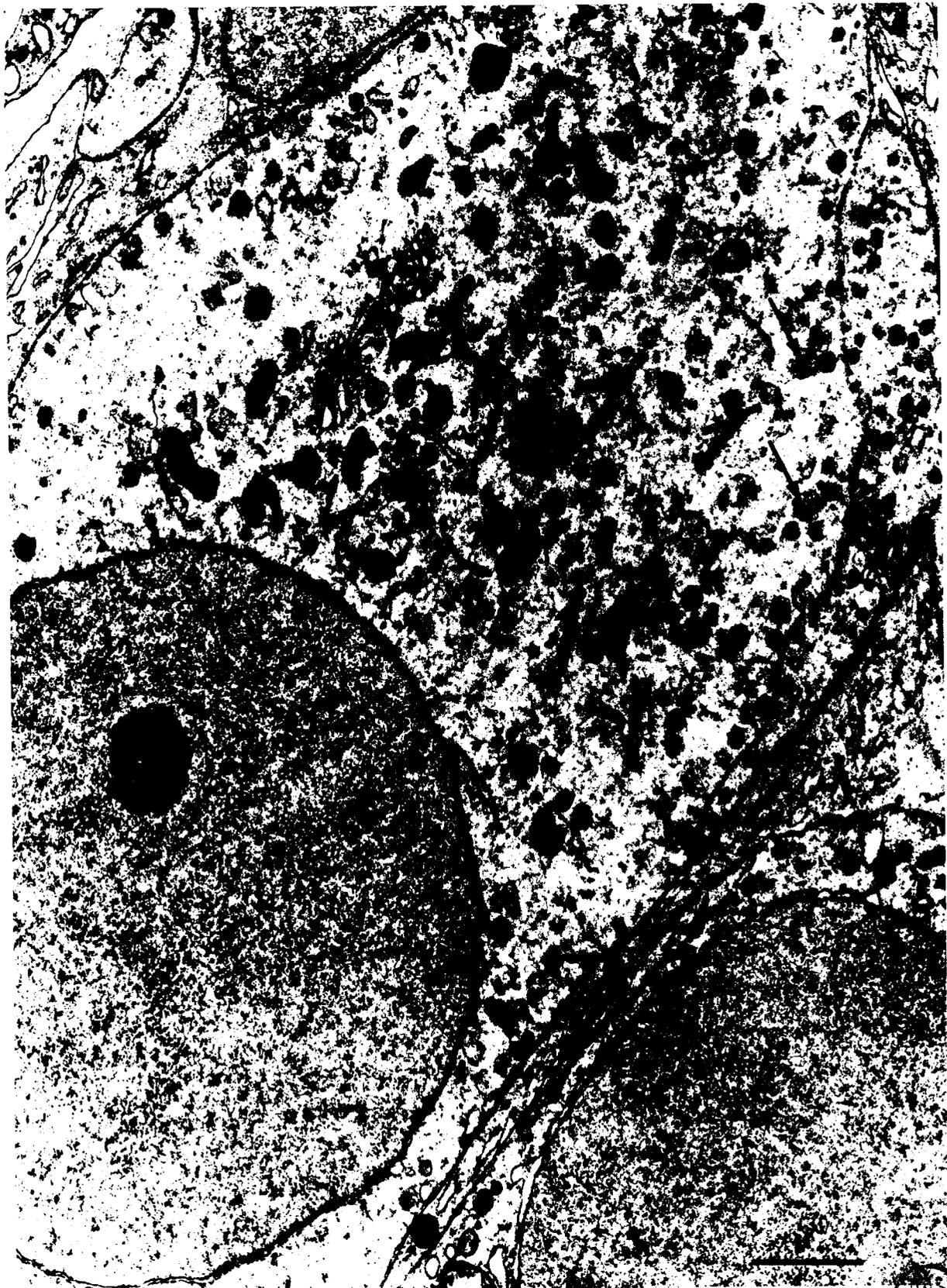
Les petites granulations sont denses aux électrons. On peut distinguer aussi (flèches) les vésicules dont les membranes sont souvent cassées.

Dans l'appareil de Golgi (G) on peut observer des grains en formation.

Les mitochondries sont de petite taille et possèdent une matrice généralement sombre.

G: x 19000





BIT'S  
LILLE

L'ergastoplasme est généralement peu développé et il forme fréquemment de petits empilements de saccules bien parallèles (Pl. V).

L'appareil de Golgi est moyennement important. Il apparaît sous forme de petits dictyosomes. On peut distinguer dans ses saccules la formation de granulations. (Pl. VI)

Les mitochondries sont de petite taille et présentent une matrice dense aux électrons.

Nous avons observé très peu d'éléments de type lysosomique dans ce type cellulaire.

### β - Technique immunocytochimique sur coupes ultrafines

Les résultats que nous avons obtenus semblent permettre une étude assez précise de la localisation des hormones dans la cellule précédemment individualisée. En effet, dans l'ensemble, il n'existe que peu de précipités correspondant à des molécules de P.A.P. dans les cellules voisines de celles présentant un fort marquage. On peut alors supposer que tous les éléments positifs visibles dans le cytoplasme sont liés à la présence de sites antigéniques spécifiques.

L'observation de ces cellules à un faible grossissement révèle l'existence d'un très fort marquage sur les granulations de 1.800 à 2.200 Å. Dans quelques cas, elles paraissent encore de taille plus importante. Par ailleurs, toutes les granulations sont recouvertes en quantité plus ou moins importante par des molécules de P.A.P. (Pl. VII).

A côté de cet intense marquage, on peut observer la présence d'une concentration de molécules de P.A.P. sur des éléments soit ronds, soit de forme plus irrégulière, qui apparaissent plus denses aux électrons que le hyaloplasme. (Pl. VIIb) Une partie au moins de ces éléments ressemble à des vésicules mais la technique permet difficilement d'observer les membranes.

Planche VII

Cellules marquées par l'anti $\alpha$  17-39 ACTH (technique au P.A.P., Cobaye)

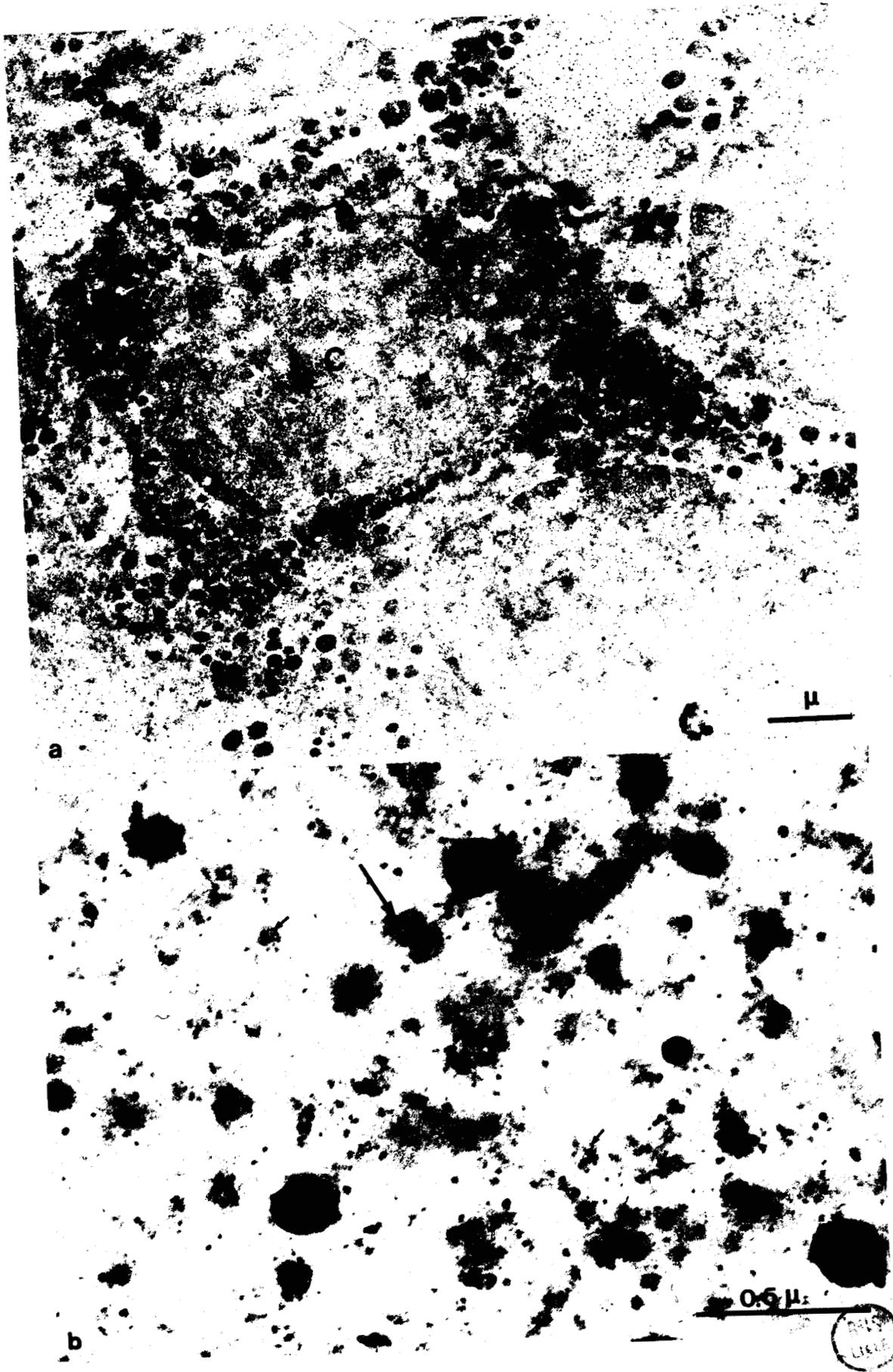
fig. a; On retrouve l'aspect général de la cellule corticotrope de forme souvent irrégulière. Les granulations sont très nettement positives.

G: x 15000

fig. b; A un plus fort grossissement, à côté des granulations on retrouve des molécules de P.A.P. groupées sur des éléments plus denses que le hyaloplasme (grande flèche), ce qui pourrait correspondre aux vésicules. Certaines molécules de P.A.P. sont également dispersées dans le reste du cytoplasme (petites flèches).

G: x 60000





Il existe enfin de très nombreuses molécules de P.A.P. dispersées dans l'ensemble du cytoplasme (Pl. VIIb). A un grossissement plus élevé, on constate que ces molécules de P.A.P. ne sont pas uniformément distribuées dans tout le cytoplasme mais qu'elles apparaissent groupées.

Nous n'avons par contre jamais pu constater d'une manière certaine, la présence ou non d'un marquage au niveau de l'appareil de Golgi. Les membranes n'apparaissent pas suffisamment visibles pour que l'on puisse individualiser cet organite cellulaire.

#### γ - Technique immunocytochimique sur coupes au cryostat

L'observation des coupes de 20  $\mu$  d'épaisseur au microscope photonique révèle que les cellules marquées ont exactement la même localisation et les mêmes caractéristiques du point de vue de la forme que les cellules individualisées sur les coupes semi-fines.

A l'échelle ultrastructurale, si les cellules ont subi quelques dommages sur le plan morphologique du fait de la congélation, un grand nombre d'organites cellulaires comme les mitochondries ou l'appareil de Golgi restent bien distincts. On constate:

- que les granulations apparaissent nettement plus denses aux électrons que les autres éléments de la cellule.
- que seules les granulations de ce type cellulaire présentent cette augmentation de densité; dans les cellules voisines les granulations apparaissent très pâles (Pl.VIII).
- que l'ensemble du cytoplasme est beaucoup plus sombre que celui des cellules environnantes. Il semble qu'il existe à son niveau un marquage plus ou moins diffus (Pl.VIIIa). Par contre, ni le contenu des saccules golgiens, ni le contenu des saccules ergastoplasmiques ne présentent de réactions positives

Planche VIII

Cellules marquées par l'anti $\alpha$  17-39 ACTH (technique à congélation, Cobaye)

fig. a; Cellule corticotrope marquée envoyant un prolongement important entre les cellules voisines. Les granulations sont plus denses que celles des autres cellules mais le cytoplasme présente également des réactions positives.

G: x 11000

fig. b; Le contenu de l'appareil de Golgi (G) est négatif.

G: x 19000

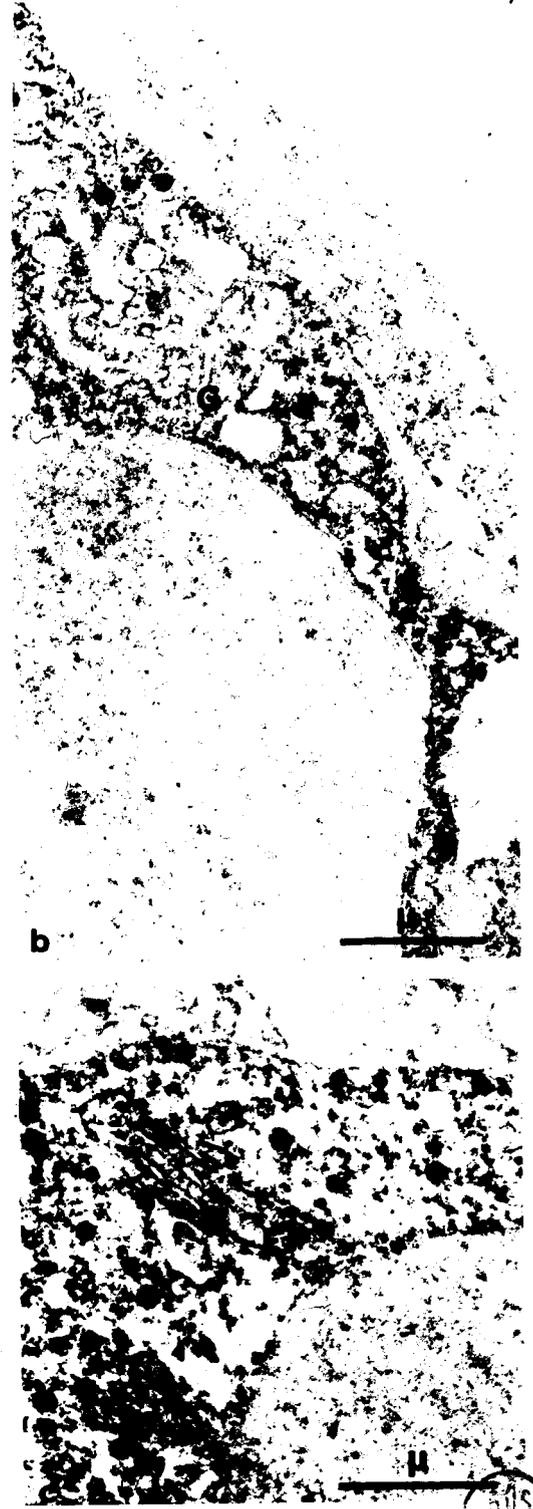
fig. c; de la même façon, aucun marquage n'est visible dans les saccules ergastoplasmiques (on retrouve par ailleurs les empilements caractéristiques).

G: x 20000





μ



b

μ

505  
LILLE

avec nos anticorps (Pl.VIIIb,c).

La matrice mitochondriale de même que le noyau n'ont jamais présenté d'augmentation de densité.

Cette méthode de marquage direct permet de bien mettre en évidence l'aspect irrégulier des cellules corticotropes du Cobaye ainsi que la longueur parfois importante des prolongements que ce type cellulaire envoie entre les cellules voisines. (Pl.VIIIa).

### 3- Discussion

L'utilisation des techniques immunocytochimiques pose toujours le problème de la pureté des anticorps. Est-on sûr de marquer d'une manière spécifique les cellules à activité corticotrope?

Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse:

-1er: les anticorps ont été testés de façons différentes ( cf "Préparation des anticorps")

-2ème: un critère morphologique nous paraît important: chez le Lérot toutes les cellules caractérisées sont du même type à l'échelle ultrastructurale; chez le Cobaye les cellules marquées sont également toutes semblables. Admettre alors que les cellules que nous individualisons ne sont pas de nature corticotrope obligerait à admettre que les anti ACTH que nous utilisons ne marquent aucune cellule à ACTH mais exclusivement un autre type cellulaire.

-3ème: lorsque nous remplaçons les anticorps spécifiques par du serum de Lapin sain, nous n'observons aucun marquage. De même lorsque nous omettons l'anticorps spécifique.

Dans l'adénohypophyse du Lérot, l'anti $\beta$  -1-24 ACTH réagit d'une façon intense avec les sites antigéniques alors que nous n'avons pas obtenu de réaction significative avec l'anti-

$\alpha$ -17-39 ACTH sur coupe semi-fine. Avec l'anti  $\beta$  MSH, les résultats sont absolument superposables à ceux observés avec l'anti  $\beta$ -1-24ACTH. Bien que ces deux peptides possèdent en commun une séquence de sept acides aminés (le 4-10 ACTH), ces réactions ne peuvent être dûes à une réaction croisée (Dubois P. et coll, 1973) car:

-la  $\beta$  MSH n'inhibe pas la réaction obtenue avec l'anti  $\beta$ -1-24 ACTH.

-la  $\beta$  1-24 ACTH n'inhibe pas la réaction obtenue avec l'anti  $\beta$  MSH.

Ces résultats indiquent donc que comme dans certaines espèces (bovins, porcins et ovins: Dubois M.P., 1972; le Rat d'Iran: Stefan et Dubois M.P., 1972; l'Homme: Phifer et coll, 1973), les cellules élaboratrices d'ACTH du Lérot sont également élaboratrices de MSH.

L'absence de résultats positifs avec l'anti  $\alpha$ -17-39ACTH peut s'expliquer par le fait que la partie 25-39 de la molécule d'ACTH est selon Dixon (1964) celle qui varie le plus d'une espèce à l'autre. On peut donc imaginer qu'il n'existe pas de réaction croisée entre la partie 17-39 ACTH que nous utilisons et la partie 17-39 ACTH du Lérot. Cependant Tramu et Dubois M.P. (1977) ont obtenus avec certains anti  $\alpha$ -17-39 ACTH et anti 25-39ACTH des résultats positifs sur les cellules corticotropes du Lérot.

En ce qui concerne les réactions immunocytochimiques observées chez le Cobaye, nous constatons que l'anti  $\alpha$ -17-39 ACTH permet d'obtenir des résultats nettement meilleurs que l'anti  $\beta$ -1-24 ACTH. On peut supposer que la plupart des déterminants antigéniques de l'ACTH chez le Cobaye se situent sur la partie 17-39 de la molécule.

Avec l'anti  $\beta$  MSH chez le Cobaye, nous n'avons jamais obtenu de résultats positifs quel que soit le mode de fixation et d'inclusion. Même avec des fixations très courtes et en congélation, les résultats ont toujours été négatifs.

Ces résultats sont en accord avec les observations de Tramu(1972, 1977). L'anticorps ne peut être mis en cause puisqu'il permet d'obtenir des résultats positifs aussi bien chez les bovins, les porcins que chez le Lérot. Par ailleurs, il paraît improbable que les techniques que nous utilisons détruisent ou masquent les sites antigéniques, dans la mesure où cela ne se produit pas dans d'autres espèces.

Deux hypothèses peuvent être envisagées:

1ère: il n'y a pas de réactions croisées avec l'anti  $\beta$  MSH que nous utilisons parce que les sites antigéniques de la  $\beta$  MSH du Cobaye sont différents de ceux d'autres espèces.

2ème: il n'y a pas de  $\beta$  MSH dans l'hypophyse du Cobaye.

Des résultats positifs ont par contre été obtenus avec l'anti  $\beta$  LPH et avec l'anti  $\beta$  endorphine, à condition d'utiliser une fixation au P.A.F. seul.

Outre la différence d'affinité pour les anticorps anti  $\beta$ -1-24 ACTH et anti  $\alpha$ -17-39 ACTH, nous avons pu constater que le marquage sur les coupes semi-fines se présentait d'une manière très différente chez le Cobaye et chez le Lérot.

Chez le Lérot, ce marquage se situe exclusivement là où se trouvent les granulations. Ceci est très visible sur certaines coupes semi-fines où des grains sécrétoires sont isolés (Pl. II). Par contre, pour les cellules corticotropes du Cobaye, le marquage est pratiquement localisé dans tout le cytoplasme, le noyau apparaissant très nettement négatif.

Lorsque nous passons à l'échelle ultrastructurale, on peut constater que les cellules corticotropes du Lérot et du Cobaye ont très peu de points communs.

Chez le Lérot, les cellules sont plutôt rondes alors que chez le Cobaye elles sont de forme très irrégulière présentant fréquemment des prolongements entre les cellules voisines.

Chez le Lérot, les granulations sont de taille très importante alors que celles observées chez le Cobaye sont de très petite taille.

Les vésicules plus ou moins denses aux électrons n'ont pas été observées chez le Lérot même après les fixations au P.A.F.

L'aspect des cellules corticotropes du Lérot n'est pas lié à la saison à laquelle les animaux ont été sacrifiés car aussi bien chez les Lérots hibernants que chez ceux sacrifiés au printemps et en été, nous avons toujours individualisé le même type cellulaire.

Si nous comparons maintenant les cellules corticotropes du Cobaye et du Lérot avec celles considérées comme telles d'autres espèces, nous constatons que seules les cellules à ACTH du Cobaye présentent de nombreuses similitudes notamment:

- la forme des cellules
- la taille et la localisation des granulations
- l'ergastoplasme peu développé

Par contre, avec le type de fixation que nous utilisons pour obtenir des réactions immunologiques positives nous avons observé chez le Cobaye des vésicules plus ou moins vides rappelant les vésicules vides ou éclatées décrites par Porte et coll (1971) dans les cellules du lobe intermédiaire du Rat. Celles-ci sont dûes selon ces auteurs à une mauvaise fixation. De fait, lorsque nous utilisons une fixation au glutaraldéhyde-paraformaldéhyde suivie de post-fixation osmique, les cellules présentent nettement moins de vésicules. Cependant, comme elles n'apparaissent pas dans tous les types cellulaires, elles doivent correspondre à une particularité morphofonctionnelle de la cellule.

Ces vésicules peuvent évoquer les "condensing-vacuoles" décrites par Palade (1975) dans les cellules du pancréas exocrine du Cobaye et qui prennent naissance en fait dans le GERL (Novikoff 1976). Cependant, dans les cellules à ACTH, elles sont

parfois en grand nombre et sont dispersées dans tout le cytoplasme alors que les "condensing-vacuoles" sont quant à elles souvent situées près de l'appareil de Golgi. Par ailleurs, nous avons observé dans de nombreux cas l'existence de granulations en voie de formation à l'intérieur des saccules golgiens, ce qui montre que le processus classique de formation des granulations existe bien dans ce type cellulaire.

En ce qui concerne les cellules corticotropes du Lérot, elles paraissent ne présenter de points communs ni avec les cellules corticotropes du Rat, ni avec celles présumées à ACTH du Hamster (Girod et coll, 1964; Deslex et coll, 1976), de la Souris (Yamada et Yamashita, 1967), des cervidés (Young et Chaplin, 1975), l'Homme (Von Lawzewitsch, 1972).

Au moment où sont parus nos premiers résultats, seules les cellules dites mélanotropes de l'Homme (Racadot et coll, 1970) pouvaient présenter de nombreux points communs avec les cellules corticotropes du Lérot.

Depuis, l'application des techniques immunocytochimiques, et notamment celles des superpositions et la méthode au P.A.P. ont permis de constater que:

1er: chez le Porc, les cellules corticotropes possèdent également des grosses granulations: 3 600 Å de diamètre (Saint Guillain et coll, 1974).

2ème: chez le Renard, les cellules d'abord individualisées comme élaboratrices d'ACTH (Bugnon et coll, 1973) ne réagissent pas avec les anticorps anti-corticotropine (Bugnon et coll, 1974). Celles qui présentent une réaction positive renferment également de grosses granulations denses aux électrons, comparables à celles observées chez le Lérot et le Porc.

3ème: Les cellules mélanotropes de l'Homme sont aussi des cellules à ACTH. Elles possèdent des granulations dont le diamètre est comparable à celui des cellules somatotropes (Moriarty, 1973).

	Forme de la cellule	Noyau	Granulations	Ergastoplasme	Golgi
COBAYE (immuno)	- irrégulière - prolongements nombreux	rond de petite taille	- peu nombreuses $1800 < \phi < 2000 \text{ \AA}$ densité variable (existence de vésicules)	- peu développé - existence de petits empilements	- moyennement important
LEROT (immuno)	- ronde ou ovale	rond	- très nombreuses $2500 < \phi < 3500 \text{ \AA}$ denses - homogènes - parfois polyhédriques	- moyennement développé - ss forme de saccules sans arrangement particulier	- moyennement développé
RAT (immuno. ind)	- étoilée	rond excentré	$2000 < \phi < 2600 \text{ \AA}$ situées en périphérie	- plus ou moins développé ss forme sacculaire	- moyennement développé
HAMSTER (ind)	- irrégulière avec prolongements	forme irrégul.	$\phi$ moyen = $1600 \text{ \AA}$ situées en périphérie	peu développé	important
BOVINS (ind)	- grande taille ovale ou polygonale	rond	$\phi \simeq 2000 \text{ \AA}$	- bien développé sacculaire	- peu important
PORCINS (immuno)	- variable		$\phi$ moyen $3600 \text{ \AA}$ très denses	- peu développé	
RENARD (ind)	- prolongements nombreux		$1000 < \phi < 1500 \text{ \AA}$ denses homogènes	- bien développé saccules parallèles	- formé de plusieurs dictyosomes dispersés dans le cytoplasme
RENARD (immuno)			$3000 < \phi < 3500 \text{ \AA}$ denses	- type sacculaire	
HOMME (ind)	- irrégulière	forme irrégul.	$\phi$ moyen $1600 \text{ \AA}$ denses	- peu développé	important
HOMME (immuno)	- ovale		$2000 < \phi < 5000 \text{ \AA}$		

TABLEAU N° V

COMPARAISON DE QUELQUES CARACTERISTIQUES ULTRASTRUCTURALES DÉCRITES DANS LES CELLULES CORTICOTROPES DE MAMMIFÈRES, INDIVIDUALISÉES SOIT PAR DES TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES (IMMUNO) OU INDIRECTES (IND).



*Apport des observations sur coupes ultrafines chez le Léro*

Cette technique nous a apporté peu de renseignements. Le seul élément positif est la présence d'un marquage sur toutes les granulations avec l'anti $\beta$ -1-24 ACTH.

Ceci signifie donc qu'il existe de l'ACTH dans toutes les granulations et qu'il n'y a pas, d'une part des granulations renfermant de l'ACTH, d'autre part des granulations renfermant de la $\beta$  MSH. Ces observations sont en accord avec celles de Moriarty et Halmi (1972) et celles de Pelletier et coll. (1977).

*Apport des observations sur coupes ultrafines et sur coupes au cryostat chez le Cobaye*

Les observations apparaissent plus intéressantes. En effet, à côté des granulations présentant des réactions positives, à des intensités variables, (ce qui peut être dû à des différences de concentration d'hormone), on constate l'existence d'un marquage extragranulaire aussi bien sur les coupes ultrafines que sur les coupes provenant de la technique à congélation. Ceci confirme nos résultats sur coupes semi-fines.

Une première hypothèse doit être envisagée: il s'agit d'un artefact et le marquage provient de l'éclatement de granulations. Ceci est possible car nous avons vu qu'avec ce type de fixation apparaissaient de nombreuses vésicules à membrane plus ou moins discontinue et qui semblaient présenter des réactions positives.

Cependant, il existe également des molécules de P.A.P. dans le reste du cytoplasme qui ne sont pas préférentiellement situées près des vésicules. On peut supposer qu'elles ne sont pas des artéfacts et que l'hormone ainsi mise en évidence ne provient pas de grains éclatés.

Dans ce cas, les sites antigéniques mis en évidence correspondent:

- soit à l'hormone ou à la prohormone à un stade précédant la formation des granulations
  - soit à une forme d'hormone qui reste libre dans le cytoplasme.
- Cette dernière hypothèse suppose l'existence d'un mode d'excrétion parallèle à l'exocytose (ce qui n'a jamais été démontré).

Par contre, s'il l'on admet qu'il s'agit de la prohormone, il faut interpréter l'absence de réactions positives dans les saccules golgiens et ergastoplasmiques: elle peut être due à une mauvaise pénétration des anticorps, à une dénaturation des sites antigéniques ou à une quantité d'antigènes trop faible pour pouvoir être mise en évidence.

Moriarty et Halmi (1972), utilisant la technique au P.A.P., signalent un marquage autour des granulations dans le cytoplasme des cellules corticotropes du Rat, mais aussi sur des granulations en voie de formation dans les saccules golgiens. Cependant, dans la majorité des cas, la localisation précise avec cette technique est très difficile à effectuer et nous ne pouvons savoir si ces granulations sont véritablement à l'intérieur ou à l'extérieur des saccules golgiens.

L'observation d'un marquage diffus dans tout le cytoplasme a également été signalée chez le Rat par Nakane (1970) dans ce type cellulaire, ainsi que par Tixier-Vidal et Tougard (1976) sur les cellules corticotropes en culture.

## CONCLUSIONS

L'individualisation de ce type cellulaire chez le Lérot puis chez le Cobaye, a permis de montrer qu'il n'existe pas de type universel de cellules corticotropes. Dans ces deux espèces, les cellules ont très peu de points communs sur le plan morphologique. Ceci veut dire qu'il paraît hasardeux d'individualiser ce type cellulaire par simple analogie à d'autres observations.

Le marquage observé dans le cytoplasme des cellules corticotropes du Cobaye dans des conditions physiologiques, permet d'envisager l'existence d'hormone immunoréactive extragranulaire.

Par contre, chez le Lérot, aucun élément ne nous permet de formuler une telle hypothèse. Ceci peut être simplement lié à un problème technique, mais on peut aussi imaginer qu'à côté des différences morphologiques, il existe entre les cellules corticotropes de différentes espèces des variations sur le plan fonctionnel.

Le fait que toutes les granulations soient marquées sur les coupes ultrafines indique qu'elles peuvent contenir plusieurs types d'hormone ( $\beta$  MSH,  $\beta$  LPH, ACTH, endorphine). Nos travaux ont montré la complexité des problèmes de fixation vis à vis de la conservation des sites antigéniques. Pour Nakane (1975), le glutaraldéhyde et le tétroxyde d'osmium dénaturent les sites vis à vis des anticorticotropines dans l'hypophyse du Rat. Moriarty obtient par contre ses meilleurs résultats avec des fixations au glutaraldéhyde.

Nous avons obtenu pour notre part, des résultats différents vis à vis du glutaraldéhyde en fonction de l'espèce mais le tétroxyde d'osmium a permis l'obtention de bonnes réactions excepté pour l'anti  $\beta$  LPH et l'anti  $\beta$  endorphine. Ces résultats ont été confirmés par Bugnon et coll (1974), Saint Guillain et coll (1974).

En conclusion, par différentes techniques, nous avons pu effectuer une caractérisation à l'échelle ultra-structurale des cellules sécrétant l'ACTH, mais vraisemblablement aussi la  $\beta$  LPH et ses dérivés (la  $\beta$  MSH et les endorphines) chez le Lérot et chez le Cobaye.

LES CELLULES GONADOTROPES

A/ Etat des connaissances concernant la structure fine de ce type cellulaire au début de nos travaux

La microscopie photonique a permis très tôt d'individualiser deux types cellulaires intervenant dans la fonction gonadotrope (Herlant, 1942, 1949; Catchpole, 1949). A l'exception de Barnett et coll (1956), tous les auteurs ont considéré que l'un de ces types sécrétait de l'hormone folliculo stimulante (FSH) et que l'autre sécrétait de l'hormone lutéinisante (LH). Cette même distinction a été très rapidement faite en microscopie électronique par Farquhar et Rinehart (1954). Ces derniers observent en effet deux types de cellules de castration (une 6 jours après castration et l'autre 35 jours après) chez le Rat. Cette distinction sera retrouvée chez cette même espèce (Rennels 1963, Kurosumi et Oota, 1968), mais aussi chez la Souris (Barnes 1962, 1963), chez le Hamster (Girod et coll, 1964).

Il faut noter que toutes ces caractérisations ont été effectuées soit dans des conditions expérimentales (castration) soit au cours de situations physiologiques particulières (oestrus, dioestrus permanent, gestation).

Dans certaines espèces, les cellules gonadotropes individualisées en microscopie photonique apparaissent groupées et localisées à des endroits précis de l'adénohypophyse; l'étude au microscope électronique a pu alors être faite beaucoup plus facilement sans utiliser de conditions expérimentales (Chauve-Souris: Herlant, 1963).

A partir de la description effectuée chez plusieurs espèces, Herlant (1972) a réalisé la synthèse des critères morphologiques ultrastructuraux des cellules à FSH et à LH

### 1- Les cellules à FSH

Elles sont de grande taille et sont localisées le long de capillaires. Elles possèdent des granulations denses aux électrons dont le diamètre varie entre 1.500 et 2.500 Å. L'ergastoplasme, plus ou moins développé, prend le plus souvent un aspect vacuolaire. L'appareil de Golgi, de taille importante, présente une forme circulaire et se situe à proximité du noyau.

Une particularité est observée dans les cellules à FSH du Rat: elles possèdent en plus des granulations classiques, de très grosses granulations peu denses aux électrons, pouvant atteindre 7.000 Å de diamètre.

### 2- Les cellules à LH

Ce sont des cellules plus petites, également situées près des capillaires, de forme polyhédrique ou allongée. Elles renferment des granulations d'environ 2.500 Å de diamètre dont la densité aux électrons est très variable. L'ergastoplasme, peu développé, se présente sous forme de petits saccules aplatis. L'appareil de Golgi est peu étendu.

### B/ Etat des travaux de nature immunohistochimique en microscopie photonique

Utilisant une technique d'immunofluorescence, Rennels (1963) individualise des cellules sécrétant de la FSH distinctes de celles à LH. Cependant, depuis ce premier travail, pratiquement aucun auteur n'a pu, en employant des anti LH, des anti FSH d'origines différentes ou des anti HCG, anti PMSG, distinguer deux types de cellules: tous ces anticorps marquent invariablement aussi bien les cellules à FSH que les cellules à LH. Une revue de ces différentes observations a été effectuée par Girod (1976).

Nakane (1970) observe une différence de réactions avec de l'anti FSH ovine et de l'anti LH ovine entre les cellules situées en périphérie de l'adénohypophyse de Rat et celles de la région centrale. Mais, ce qui importe le plus, c'est que le premier, il reprend l'hypothèse de Barrnett et coll (1956) en déclarant "qu'il est clair que les cellules à FSH et à LH ont la même localisation dans l'adénohypophyse et que dans la plupart des cas, les deux hormones sont présentes dans la même cellule".

Il faut cependant noter que parallèlement à ces travaux, des recherches de nature plus biochimique permettent de contester ces déductions. Il est en effet apparu que les hormones glycoprotéïques sont constituées de deux sous-unités:  $\alpha$  et  $\beta$  (Li et Starman, 1964; De La Llosa et coll, 1967; Papkoff et coll, 1971; Pierce et coll, 1971; Saxena et Rathnam, 1971; Bahl et coll, 1972; De La Llosa, 1972). Des expériences d'hybridation (De La Llosa, 1972; Saxena et coll, 1973) révèlent que les sous-unités  $\alpha$  peuvent se substituer les unes aux autres et ne sont donc pas spécifiques de chaque hormone. Par contre, la sous-unité  $\beta$  est spécifique d'une hormone. Ces observations ont été confirmées par l'analyse des séquences d'acides aminés.

Cette sous-unité  $\alpha$  commune à LH et à FSH pourrait alors expliquer les résultats de Nakane (1970).

Divers procédés vont alors être utilisés pour tenter de rendre spécifiques les anticorps contre les sous-unités (Brozman, 1970). Ainsi, en saturant l'anti LH par de la FSH, on peut espérer que l'anti LH sera spécifique de la sous-unité  $\beta$  de la LH et vice versa, en saturant l'anti FSH avec de la LH, il devient spécifique de la FSH  $\beta$ . En fait, il apparaît que ces saturations donnent des résultats très variables (Brozman, 1970; Dubois, 1972b). Le seul moyen de résoudre ce problème est d'employer alors des anticorps dirigés contre la sous-unité  $\beta$ .

Seuls des anticorps dirigés contre LH $\beta$  ont d'abord

été utilisés car la séparation de FSH  $\beta$  et de FSH  $\alpha$  présente beaucoup plus de difficultés.

Les premières observations obtenues avec l'anti LH  $\beta$  sont dues à Tougard et coll (1971) et seront suivies par d'autres travaux (Baker et coll, 1972; Dubois M.P., 1972). Il apparaît alors qu'un seul type de cellule gonadotrope est marqué, aussi bien avec l'anti LH  $\beta$  qu'avec l'anti LH totale chez le Rat (Tougard et coll, 1971; Baker et coll, 1972), chez les bovins et les porcins (Dubois M.P., 1972).

Ceci indique donc que toutes les cellules gonadotropes contiennent de la LH chez ces espèces.

En ce qui concerne le Cobaye et le Lérot, les observations effectuées par Tramu et Dubois M.P. (1972), Tramu et coll (1974), Tramu (communication personnelle) permettent de constater que l'anti LH ovine, l'anti PMSG, l'anti-FSH porcine marquent les mêmes cellules chez ces deux espèces; une seule catégorie de cellules a donc pu être individualisée en microscopie photonique.

#### C/ Résultats obtenus par l'application des techniques immunocytochimiques à la microscopie électronique

Trois observations ont été effectuées sur l'adénohypophyse de Rat. La première est due à Nakane (1970), la deuxième à Tougard et coll(1973) et la troisième à Moriarty (1975).

Nakane utilise la même technique que pour les cellules corticotropes et décrit un type de cellules réagissant avec l'anti FSH et avec l'anti LH. Ces cellules contiennent des granulations de 2.000 à 2.500 Å de diamètre et sont ovales. Par contre, les cellules réagissant avec l'anti FSH et non avec l'anti LH sont anguleuses et les granulations sont situées près de la membrane cytoplasmique.

La deuxième observation (Tougaard et coll, 1973) est beaucoup plus précise. A partir de tissus fixés au P.A.F. des coupes sont obtenues à l'aide d'un sectionneur de Farquhar et subissent les réactions immunologiques avant l'inclusion. L'anti LH ovine, l'anti LH  $\beta$  ovine et l'anti FSH ovine marquent alors deux types cellulaires apparemment différents, l'un contenant à la fois des granulations de 2 000 Å et de 3 000 à 7 000 Å de diamètre et l'autre, présentant exclusivement des granulations de 2 000 Å.

Pour ces auteurs, ces deux aspects correspondent à un même type cellulaire observé à des stades de fonctionnement différents. Les deux types cellulaires décrits par Kurosumi et Oota (1968) ne présentent donc pas de dualité immunologique.

L'étude de Moriarty (1975) effectuée avec la technique au P.A.P., aboutit aux mêmes conclusions. Cependant, il apparaît un certain nombre de différences par rapport aux travaux de Tougaard et coll quant à la localisation des sites antigéniques. Pour elle en effet avec l'anti LH  $\beta$ , seules les réactions obtenues dans les grosses granulations seraient spécifiques.

En conclusion, chez le Rat, un seul type cellulaire gonadotrope a pu être individualisé à l'échelle ultrastructurale par des techniques immunocytochimiques.

En ce qui concerne l'étude d'autres espèces animales, nous mentionnerons les travaux de Dacheux et Dubois M.P. (1976) qui ont décrit les cellules gonadotropes des bovins en employant la technique immunocytochimique au P.A.P.

#### D/ Données récentes

Le fait essentiel est l'utilisation pour la première fois d'anti FSH  $\beta$  pour l'étude immunocytoenzymologique de l'adénohypophyse du Rat (Herbert, 1975) et du Singe (Herbert, 1976). Dans les deux cas, ce dernier observe un marquage absolument superposable avec l'anti FSH  $\beta$  et l'anti LH  $\beta$ .

Un autre travail utilisant de l'anti FSH $\beta$  a été réalisé à l'échelle de la microscopie électronique par Moriarty (1976), Moriarty et Garner (1977). Ces auteurs constatent que toutes les cellules marquées par l'anti LH $\beta$  sont également positives avec l'anti FSH $\beta$ , mais en plus, ce dernier anticorps marque certaines cellules corticotropes.

L'étude que nous avons entreprise a donc eu pour but de définir la structure fine de la cellule gonadotrope du Lérot et du Cobaye, et de vérifier si à l'aide des techniques immunocytochimiques, il est possible de mettre en évidence à l'échelle ultrastructurale plusieurs types de cellules gonadotropes. Nos résultats ont fait l'objet de publications: Beauvillain, Tramu, Dubois M.P. 1974; Tramu, Beauvillain, Dubois M.P., 1974b; Beauvillain, Tramu, Dubois M.P. 1975.

### E/ Recherches personnelles

L'étude des cellules gonadotropes chez le Lérot et le Cobaye a été effectuée de la même façon que pour celle des cellules corticotropes.

#### Superpositions:

- Fixateurs: - glutaraldéhyde-paraformaldéhyde suivi de tétroxyde d'osmium
- P.A.F.
- Anticorps: - Anti LH ovine (1/40è - 1h)
- Anti PMSG (préparé par Tramu) (1/40è - 1h)
- Anti LH  $\beta$  porcine (1/80è - 1h)
- Anti FSH  $\beta$  de Rat (fourni par le Docteur Parlow, National Institut of Arthritis, Metabolism and digestive disease) (1/500è - 24h à 4°C)

- Points particuliers: Des difficultés sont apparues dans l'utilisation de l'immunofluorescence. Il persistait une forte fluorescence de fond. Chez le Lérot, nous l'avons atténuée en effectuant avant la réaction immunocytochimique une double oxydation des coupes: 3 mn d'eau oxygénée à 10p 100 et 10 mn d'acide periodique à 10p 100. Par contre chez le Cobaye, ce n'est qu'en utilisant la peroxydase comme marqueur que nous avons pu obtenir une bonne réaction.

#### Technique au P.A.P. sur coupe ultrafine:

- Fixateurs: - glutaraldéhyde )
- glutaraldéhyde-paraformaldéhyde ) Lérot
- suivi de tétroxyde d'osmium )
- P.A.F.: Cobaye
- Anticorps: - Anti LH (1/40è 5 mn à température ambiante)
- Anti LH  $\beta$  (1/500è - 36h à 4°C)
- Anti FSH  $\beta$  (1/500è - 36h à 4°C)

#### Technique à congélation:

Seul l'anti LH  $\beta$  au 1/80è a été utilisé.

## Planche IX

Comparaison de coupes semi-fines ayant subi des réactions immunohistochimiques avec différents anticorps antigonadotrophines (Lérot)

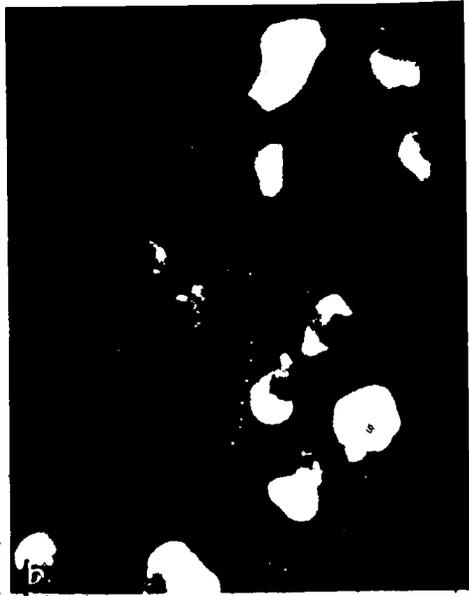
Avec l'anti PMSG (fig. 4a) et l'anti LH  $\beta$  porcine (fig. 4b) les mêmes cellules sont immunofluorescentes.

Avec l'anti LH ovine totale (fig. 4c) et l'anti LH  $\beta$  porcine (fig. 4d) une superposition semblable est observée.

Enfin avec l'anti LH  $\beta$  porcine (fig. 4e) et l'anti FSH  $\beta$  de Rat (fig. 4f) on peut également constater que ce sont les mêmes cellules qui réagissent.

Ces observations indiquent donc que l'anti LH  $\beta$ , l'anti FSH  $\beta$ , l'anti LH totale et l'anti PMSG révèlent les mêmes cellules





BUS  
LICLE

## 1- Résultats

### a/ Les cellules gonadotropes du Lérot

#### α - Technique des superpositions

##### *- Coupes semi-fines*

Quel que soit le fixateur utilisé, les différents anticorps: anti PMSG, anti LH ovine, anti LH  $\beta$  porcine, anti FSH  $\beta$  de Rat, ont marqué sur les coupes semi-fines les mêmes cellules (Pl. IX).

Aucune cellule marquée par l'anti FSH  $\beta$  de Rat et non réactive avec l'anti LH  $\beta$  porcine n'a pu être individualisée. Il faut cependant noter que les réactions que nous avons obtenues avec l'anti FSH  $\beta$  ont toujours été moins intenses qu'avec les autres anticorps. Ceci est d'ailleurs absolument comparable à ce qui est observé sur des coupes à la paraffine.

Les cellules ainsi repérées sont uniformément distribuées dans tout le parenchyme et sont toujours localisées près des capillaires. Elles ne présentent pas de forme particulière.

Sur la coupe semi-fine adjacente, les colorations au tétrachrome de Herlant et au P.A.S. permettent de constater que ces cellules sont basophiles et P.A.S. positives.

##### *- Coupes ultrafines*

Les cellules marquées par la réaction d'immuno-fluorescence sont retrouvées sur les coupes ultrafines en utilisant comme moyen de comparaison une coupe semi-fine adjacente colorée par le tétrachrome de Herlant.

Ces cellules présentent un cytoplasme plus dense aux électrons que celui des cellules voisines (Pl. X).

## Planche X

Superposition d'observations de coupes semi-fines et ultrafines (Lérot)

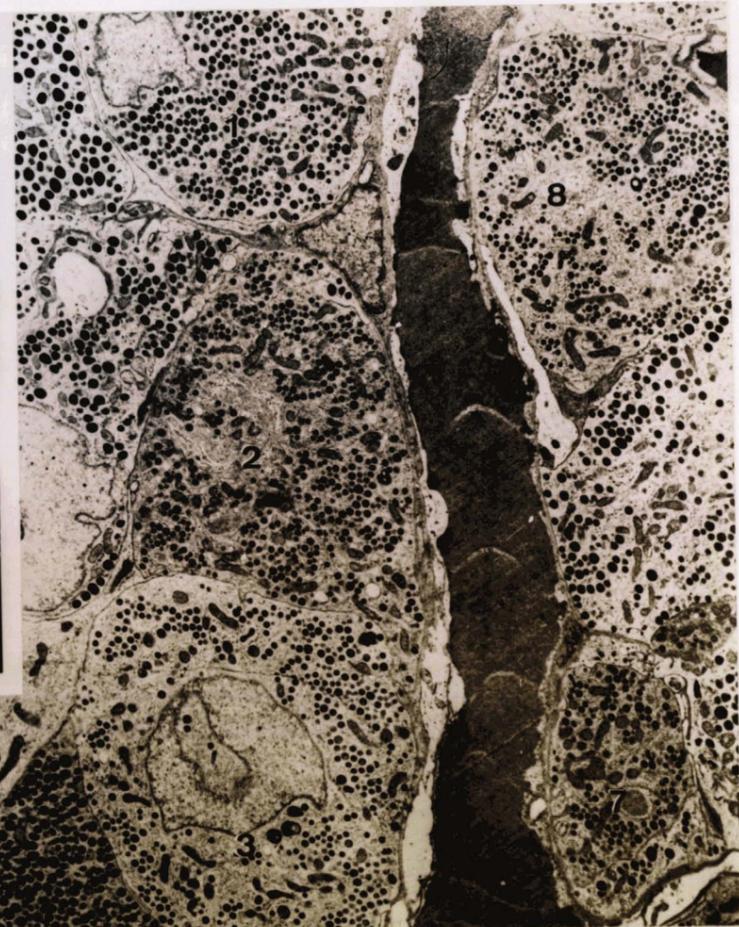
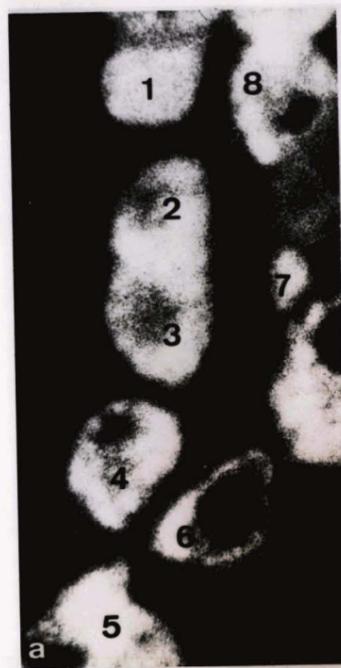
Sur la fig. a, 8 cellules sont mises en évidence par une réaction d'immunofluorescence obtenue avec l'anti LH ovine totale. Les cellules sont situées près d'un capillaire bien visible sur la fig. b (coupe colorée au tétrachrome de Herlant).

Ces 8 cellules peuvent être retrouvées sur la coupe ultrafine adjacente (fig. c).

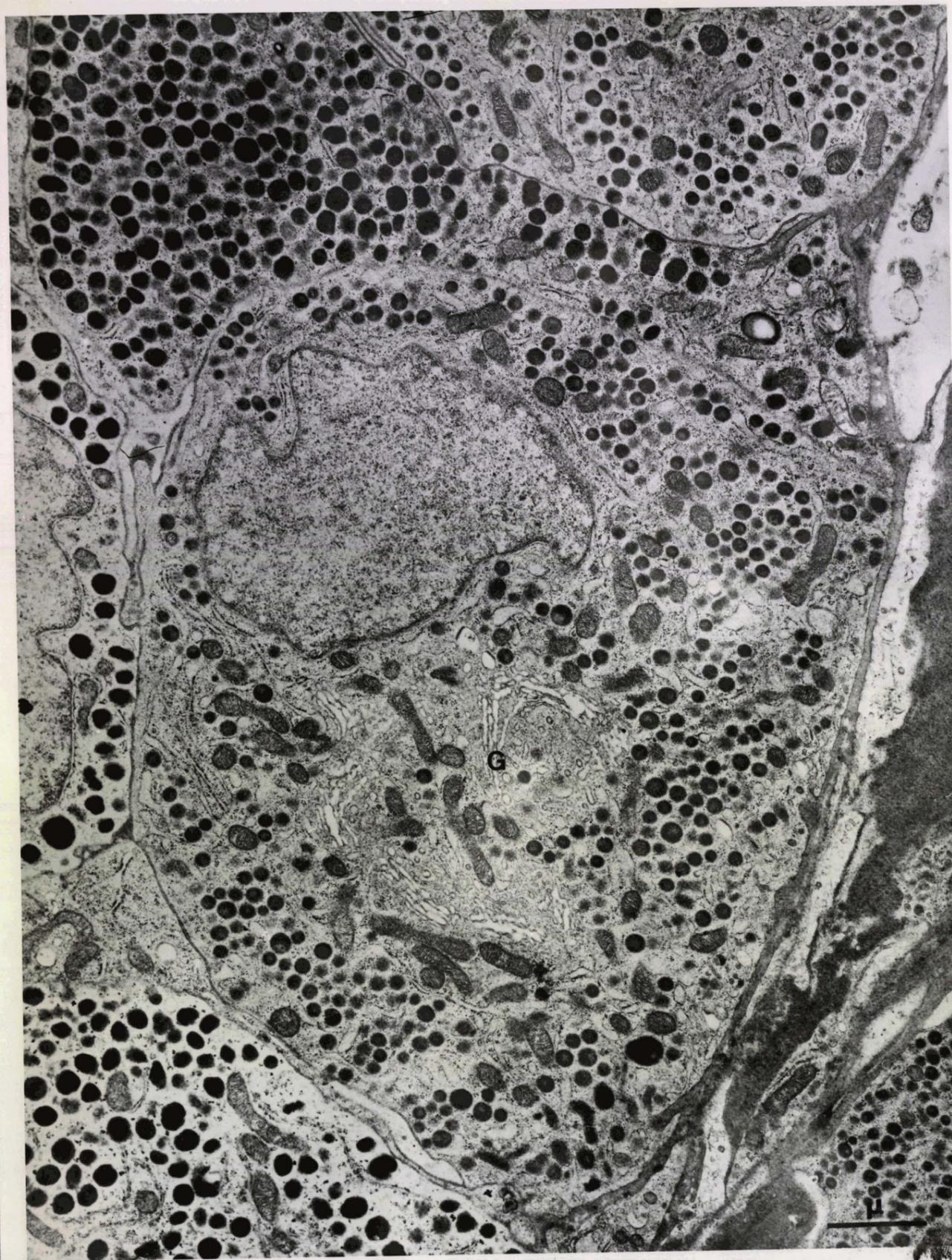
On constate qu'elles possèdent de nombreuses caractéristiques communes.

La microphotographie de droite correspond à un plus fort grossissement de la cellule n°4. On peut remarquer l'étendue de l'appareil de Golgi, l'aspect particulier des granulations ainsi que le noyau assez souvent irrégulier.

G: x 7000



300  
LILLE



300  
LILLE

Leur noyau est de forme irrégulière et presque toujours indenté (Pl. X). Le nucléole semble peu volumineux car nous l'avons rarement observé sur nos coupes.

Les granulations sont nombreuses et présentent une densité aux électrons assez modérée (Pl. XI). Leur diamètre se situe entre 1.800 et 2.000 Å. Elles sont dispersées dans tout le cytoplasme. On observe très nettement un espace clair entre le grain central et la membrane qui l'entoure. Ce grain a par ailleurs un aspect souvent hétérogène dû à la présence d'une zone de plus faible densité aux électrons généralement localisée en bordure (Pl. XI)

L'ergastoplasme est parfois très développé et dans ce cas, il est constitué de citernes dilatées contenant un matériel qui est plus sombre que le hyaloplasme (Pl. XIa). Cette particularité ajoutée à la présence de nombreux ribosomes libres, confère à la cellule son aspect général contrasté.

Dans d'autres cellules, l'ergastoplasme est plus réduit et apparaît alors sous forme de petits saccules sans orientation particulière (Pl. XIb).

L'appareil de Golgi peut être de très grande taille et présente alors fréquemment des saccules dilatés (Pl. XIb). Cette observation a surtout été faite dans les cellules où l'ergastoplasme était peu développé. Les dictyosomes sont situés les uns à côté des autres et constituent une région golgienne circulaire, caractéristique des cellules gonadotropes.

Les mitochondries présentent une matrice très dense aux électrons et les crêtes sont souvent dilatées. Elles sont souvent très nombreuses dans la région périgolgienne.

β - Technique immunocytochimique  
sur coupes ultrafines

- Avec l'anti LH totale ovine et l'anti LHβ porcine

Par cette méthode nous avons marqué des cellules

Planche XI

Fort grossissement de cellules gonadotropes de Lérot

fig. a; Cellules présentant un ergastoplasme bien développé sous une forme vacuolaire. Cet ergastoplasme contient un matériel de densité moyenne aux électrons. Les ribosomes libres sont nombreux. G: appareil de Golgi

G: x27000

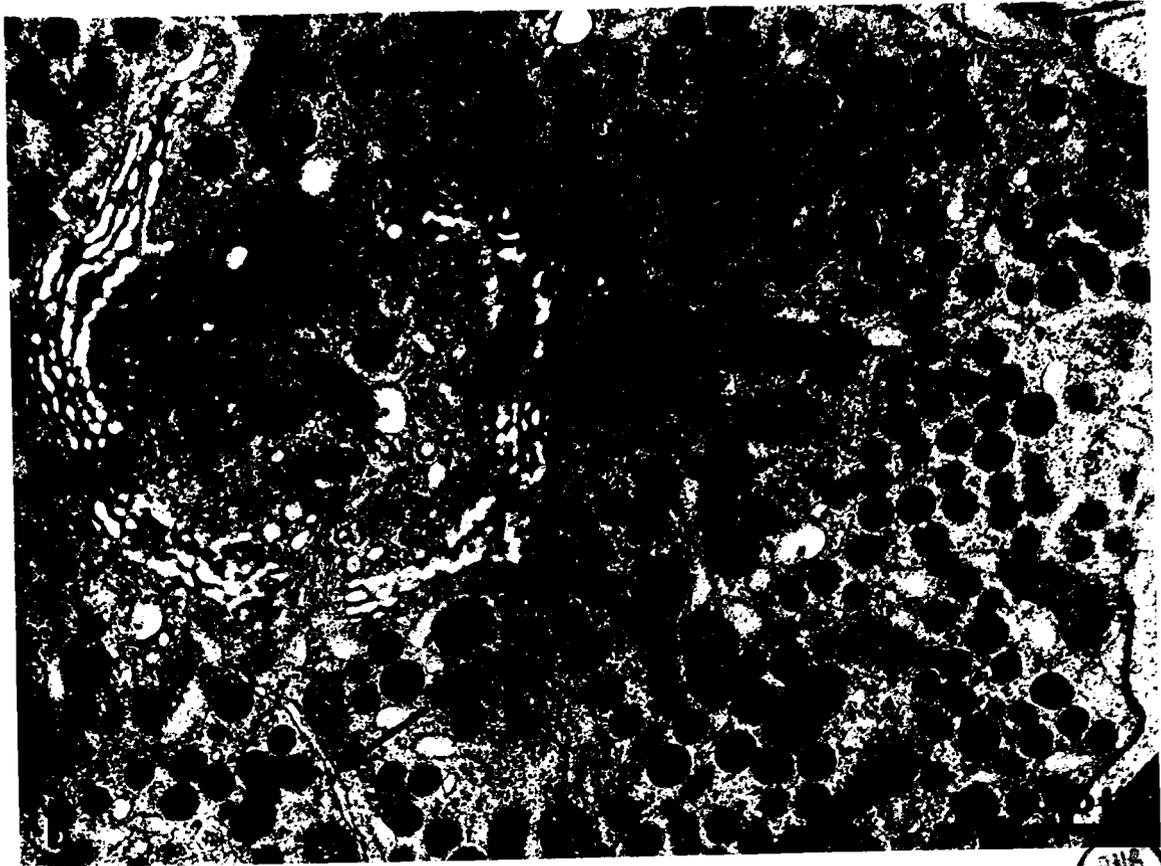
fig. b; Dans ce deuxième aspect, l'ergastoplasme est moins important et le plus souvent de forme sacculaire (flèche).

Par contre l'appareil de Golgi (G) est très développé et a une forme circulaire.

Dans les deux cas, on peut remarquer l'hétérogénéité de densité des grains contenus dans les granulations.

G: x27000





818  
L11E

situées exclusivement près des capillaires. Le marquage se localise sur toutes les granulations dont le diamètre varie entre 1.800 et 2.000 Å. (Pl. XII).

Ces critères indiquent que ces cellules sont bien les mêmes que celles individualisées par la technique des superpositions.

Nous n'avons pas pu déceler un marquage significatif ailleurs que sur les granulations: le contenu des vacuoles ergastoplasmiques n'a donc pas présenté de réaction positive.

*- Avec l'anti FSH $\beta$  de Rat*

Les résultats que nous avons obtenus avec cet anticorps sont absolument superposables à ceux enregistrés avec l'anti LH $\beta$ . Les cellules présentant une réaction positive se trouvent également près des capillaires et les granulations possèdent toutes, de façon plus ou moins importante, des molécules de P.A.P. (Pl. XIII).

L'ergastoplasme n'a jamais présenté de marquage.

Par ailleurs, aucun autre type cellulaire n'a montré de réaction positive.

b/ Les cellules gonadotropes du Cobaye

$\alpha$  - Technique des superpositions

*- Coupes semi-fines*

Les anticorps anti LH ovine, anti PMSG, anti LH $\beta$  porcine, permettent de mettre en évidence exactement les mêmes types cellulaires sur les coupes semi-fines, aussi bien avec des fixations glutaraldéhyde-paraformaldéhyde suivi de tétroxyde d'osmium que P.A.F. suivi de tétroxyde d'osmium.

Par contre, avec l'anti FSH $\beta$  de Rat, les mêmes

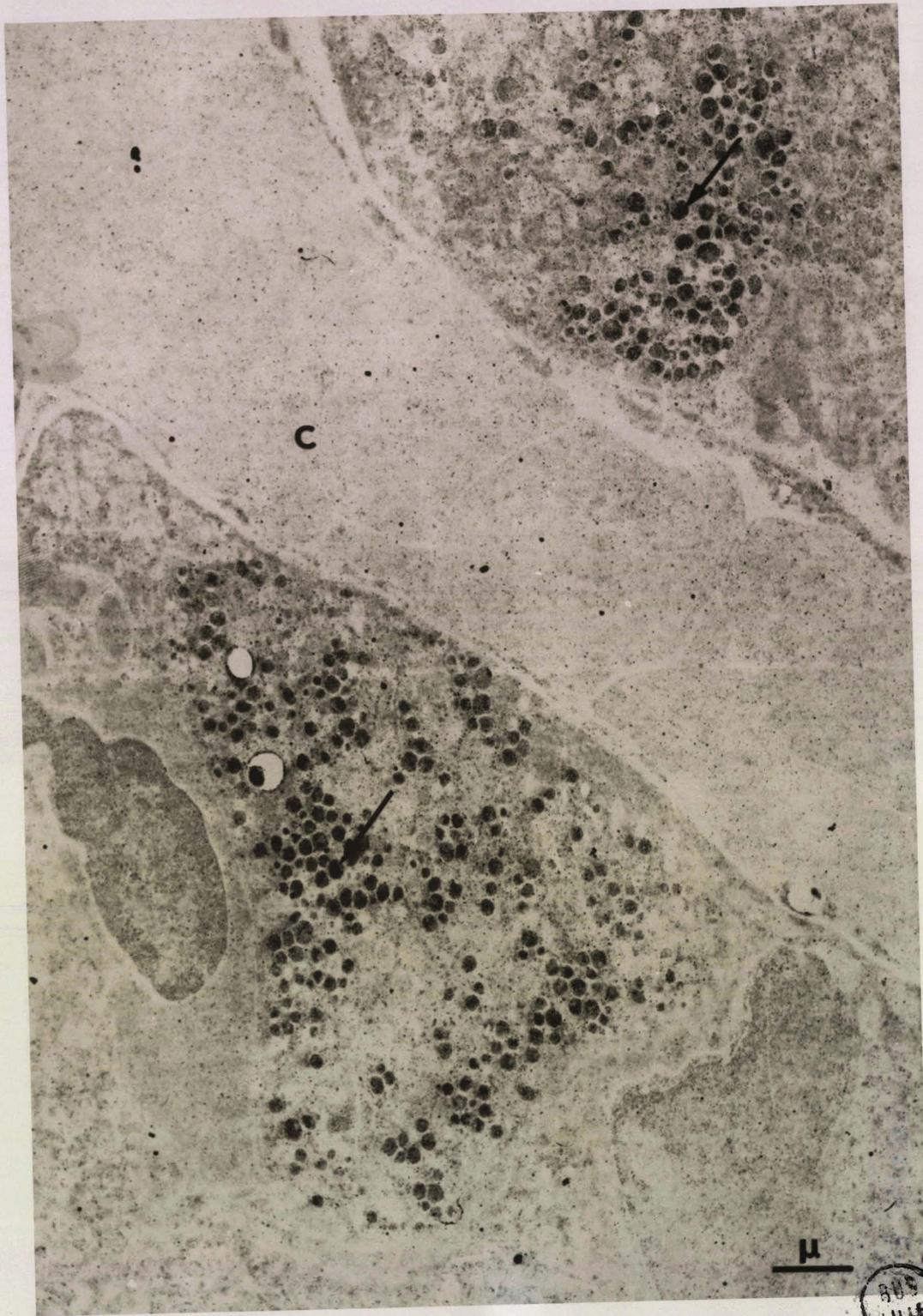
Planche XII

Cellules marquées par l'anti LH ovine totale (technique  
au P.A.P., Lérot)

On peut observer un marquage sur les granulations de cellules  
situées près de capillaires. Il apparaît par contre très difficile  
de distinguer le reste du cytoplasme. Des précipités non spécifiques  
sont présents sur l'ensemble de la coupe.

G: x 12000





C

μ

505  
LILLE

Planche XIII

Cellule marquée par l'anti FSH $\beta$  de Rat (technique au P.A.P., Lérot)

Les réactions positives sont uniquement observées sur les granulations d'un seul type cellulaire. Ces granulations semblent toutes marquées mais à des intensités variables.

G: x 10000



H

MTC  
L112

types de fixation n'ont jamais permis d'observer un marquage. Cependant, lorsque nous avons utilisé des fixations P.A.F. seul ou glutaraldéhyde-paraformaldéhyde seul, nous avons obtenu un marquage exclusivement des cellules thyroïdiques.

Les cellules marquées par l'anti LH  $\beta$  sont retrouvées dans toute la glande, mais il apparaît qu'une concentration très importante est située en avant, près de la tige pituitaire. La forme de ces cellules est très variable, mais dans la grande majorité des cas, elles apparaissent allongées ou anguleuses. Ces cellules sont presque toujours situées près des capillaires.

#### - Coupes ultrafines

Les cellules marquées, observées sur coupes semi-fines, sont repérées directement sur les coupes ultrafines adjacentes. Le fait que les cellules gonadotropes soient situées près des capillaires facilite énormément le repérage (Pl. XIV).

Le cytoplasme est en général assez dense aux électrons et le noyau rond, souvent excentré, contient fréquemment un nucléole volumineux.

Les granulations sont en nombre assez variable et sont réparties dans tout le cytoplasme. Elles sont rondes et mesurent entre 2.000 et 2.500 Å de diamètre. Le grain central n'apparaît pas de densité homogène aux électrons et il est toujours nettement détaché de la membrane qui l'entoure. (Pl. XV).

L'ergastoplasme est moyennement développé et se présente sous forme de saccules plus ou moins allongés, dispersés dans tout le cytoplasme. Parfois ces saccules sont cependant parallèles les uns par rapport aux autres. Par contre, cet ergastoplasme est très rarement vacuolaire.

L'appareil de Golgi est souvent de grande taille et il est formé de plusieurs dictyosomes situés les uns à côté des autres, à proximité du noyau. Des granulations en voie de formation sont rarement observées dans les saccules. (Pl. XV).

Planche XIV

Superposition d'observations de coupes semi-fine et ultrafine  
(Cobaye)

fig. a; Deux cellules sont mises en évidence par l'anticorps  
anti LH  $\beta$  porcine (G).

fig. b; Ces deux cellules gonadotropes (G) sont alors retrouvées  
sur la coupe ultrafine. Elles sont comme dans la majorité des cas situées  
près d'un capillaire. On peut remarquer l'abondance des mitochondries  
autour de l'appareil de Golgi.

G: x9000





LILLE

Les mitochondries sont nombreuses, allongées et présentent une matrice dense aux électrons. De plus, elles sont souvent plus concentrées autour de l'appareil de Golgi. (Pl. XV)

Des lysosomes et des dérivés lysosomiques sont visibles dans un certain nombre de cellules et sont plus fréquents que dans les autres types cellulaires.

L'observation simultanée des coupes semi-fines et des coupes ultrafines permet de constater que le marquage enregistré en microscopie photonique se situe essentiellement au niveau des granulations. (Pl. XIV).

$\beta$  - Technique immunocytochimique  
sur coupe ultrafine

- avec l'anti LH  $\beta$

Les cellules marquées présentent les mêmes caractéristiques (situation et forme) que les cellules individualisées par la technique des superpositions. Les granulations mesurent de 2 000 à 2 500 Å et sont toutes recouvertes par des molécules de P.A.P. (Pl. XVIa, b)

Aucun marquage n'a pu être décelé ni dans le cytoplasme, ni dans les saccules de l'ergastoplasme et de l'appareil de Golgi. Par contre, les granulations situées en périphérie de ce dernier, mais non dans les saccules, présentent comme les autres granulations une réaction très nettement positive. (Pl. XVIb).

- avec l'anti FSH  $\beta$

Aucun résultat positif n'a pu être obtenu avec cet anticorps quel que soit le mode de fixation utilisé. Nous n'avons pas retrouvé avec cette technique le marquage que nous avons observé sur les coupes semi-fines après des fixations glutaraldéhyde-paraformaldéhyde et P.A.F. seules.

Planche XV

Cellule gonadotrope de Cobaye à un plus fort grossissement

L'appareil de Golgi est de grande taille (G) et de nombreuses mitochondries allongées sont localisées à sa proximité.

Le grain est souvent hétérogène (flèche) et apparaît nettement séparé de la membrane qui l'entoure.

On peut également constater qu'il existe de nombreux ribosomes libres.

G: x17500





0.5μ

340  
LIFE

- Technique immunocytochimique  
après congélation

En microscopie photonique, sur les coupes de 20  $\mu$  d'épaisseur, nous avons pu vérifier que les cellules marquées avaient la même répartition dans l'hypophyse que celles observées sur les coupes semi-fines.

En microscopie électronique la conservation ultrastructurale des cellules est assez satisfaisante. Quelques déchirures sont dues à la congélation mais les organites cellulaires sont facilement identifiables (Pl. XVII).

Les granulations sont marquées à des intensités variables. Dans un certain nombre de cellules, il apparaît nettement que ce sont les granulations situées en périphérie de la cellule qui présentent le marquage le plus intense, alors qu'au centre de la cellule les granulations sont plus faiblement contrastées. (Pl. XVII).

Les mitochondries et le noyau ne présentent pas d'augmentation de densité aux électrons qui pourrait laisser supposer l'existence d'une réaction positive à leur niveau. Par contre, dans certaines zones du cytoplasme, on peut distinguer un léger marquage diffus. Cependant, il est possible qu'en périphérie, une partie de cette réaction soit liée à l'éclatement des granulations.

On observe également l'existence d'une forte augmentation de la densité aux électrons des membranes de l'ergastoplasme alors que ceci n'est pas observé sur les membranes des mitochondries. Le contenu des saccules ergastoplasmiques comme celui des saccules golgiens reste toujours négatif. (Pl. XVII).

Planche XVI

Cellules marquées par l'anti LH  $\beta$  porcine  
(technique au P.A.P.; Cobaye)

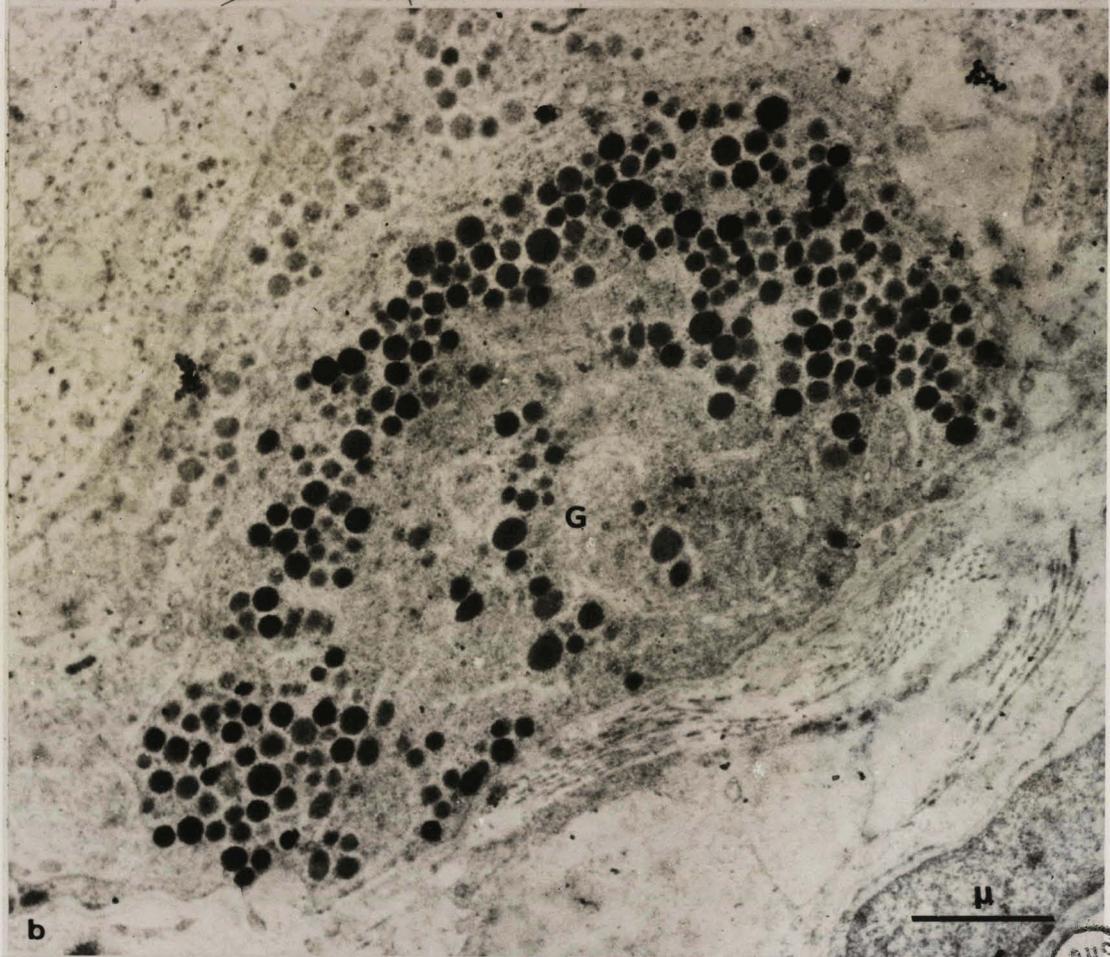
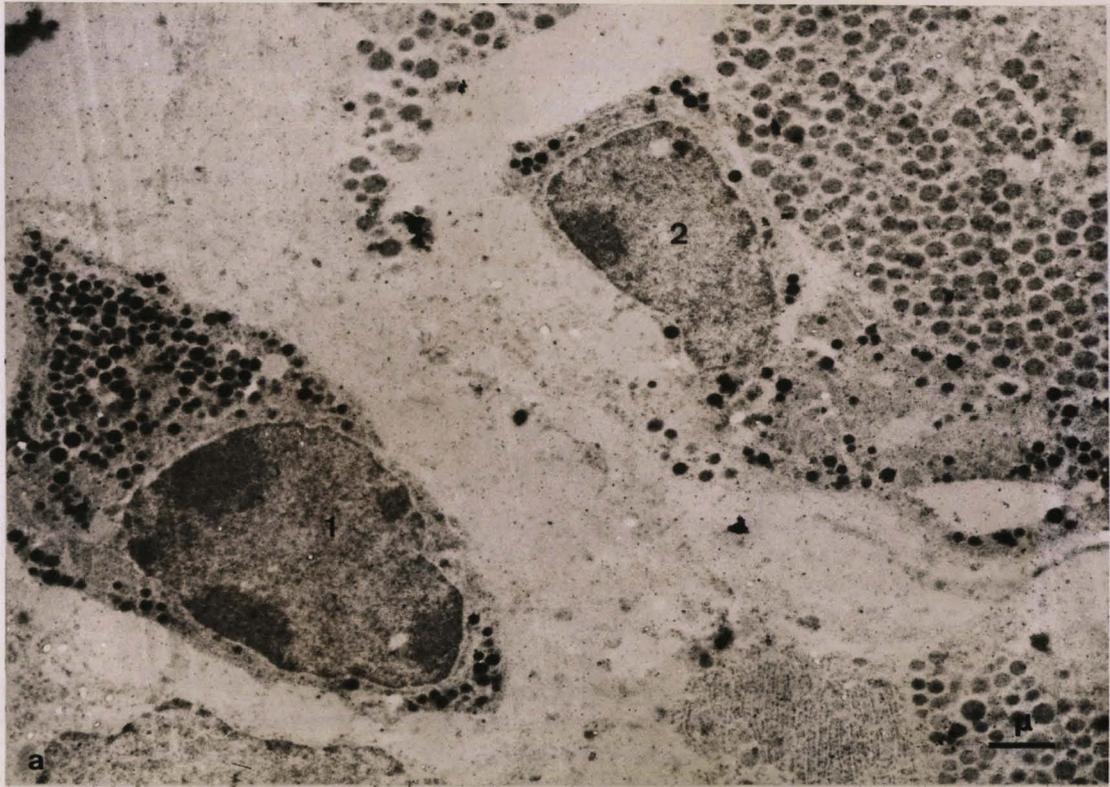
fig. a; Deux cellules présentent des granulations très contrastées. L'aspect général de ces cellules est comparable à celui observé par la technique de superposition. Toutes les granulations possèdent des molécules de P.A.P.

G: x9000

fig. b; Dans l'appareil de Golgi (G) il n'y a pas de marquage.

G: x18500





BUS  
LILLE



μ



thyréotropes.

Il n'y a donc pas de réaction croisée entre la sous-unité  $\alpha$  de LH ovine et la sous-unité  $\alpha$  de la TSH de Cobaye et de Lérot. Ces résultats concordent avec ceux de Vaitikaitis et coll (1972) montrant que l'existence d'une réaction croisée entre les espèces intéresse surtout la sous-unité  $\beta$  alors que la spécificité zoologique se trouve essentiellement dans la sous-unité  $\alpha$ . C'est probablement la raison pour laquelle les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'anti LH  $\beta$  porcine.

Il existe enfin une réaction croisée entre les sous-unités  $\beta$  de FSH du Rat et de FSH de Lérot.

Il nous faut cependant rester assez prudent quant aux résultats obtenus avec l'anti FSH  $\beta$  de Rat car nous n'avons pas pu effectuer tous les contrôles immunocytochimiques; en particulier, n'ayant pu nous procurer l'antigène, la saturation de l'anticorps par ce dernier n'a pu être pratiquée.

Chez le Cobaye, cet anticorps donne des résultats surprenants sur les coupes semi-fines où nous avons vu qu'avec certaines fixations seules les cellules thyréotropes semblaient marquées. Tramu (communication personnelle), utilisant ce même anticorps, observe sur des hypophyses fixées au Bouin Hollande Herlant et incluses dans de la paraffine, un marquage de faible intensité sur l'ensemble des cellules glycoprotéïques (gonadotropes et thyréotropes).

Le fait que nous n'ayons aucune réaction positive sur les tissus fixés soit au glutaraldéhyde-paraformaldéhyde, soit au P.A.F. suivi de tétroxyde d'osmium, et inclus dans l'araldite, peut alors s'expliquer par le fait que cette technique modifie, masque ou détruit même les sites antigéniques de FSH chez le Cobaye. Nakane (1975) signale que "FSH perd son

immunoréactivité quand les glandes sont incluses dans le méthacrylate ou dans l'épon". Si cela est vrai pour le Cobaye, il faut remarquer que ce n'est pas le cas pour le Lérot.

Nous avons noté cependant que l'intensité de la réaction chez le Lérot était nettement plus faible que celle obtenue avec l'anti LH  $\beta$  mais ceci est observé aussi bien sur les coupes semi-fines que sur des coupes ayant été incluses dans de la paraffine. Il ne semble pas que la raison doive en être attribuée au titre de l'immunsérum, car l'utilisation d'anticorps à des dilutions très différentes (de 1/40<sup>e</sup> au 1/1.000<sup>e</sup>) provoque des réactions d'intensité semblable. Il existe donc vraisemblablement une certaine dénaturation de la FSH ou de ses sites antigéniques au cours des traitements histologiques quels qu'ils soient. Tixier-Vidal et coll (1975) ont constaté cette même différence dans l'intensité des réactions obtenues avec soit l'anti FSH ovine, soit l'anti LH ovine dans l'adénohypophyse de Rat.

Reste à comprendre l'existence d'un marquage sur les cellules thyroïdiques du Cobaye en utilisant l'anti FSH  $\beta$ . Deux solutions semblent alors possibles:

- Il existe une réaction croisée entre la FSH  $\beta$  du Rat et la TSH du Cobaye.
- Il existe un contaminant dans l'anticorps qui apparaît chez le Cobaye et non chez le Lérot.

Par des techniques immunocytochimiques, on ne met donc en évidence qu'un seul type de cellules en microscopie photonique. On pouvait cependant penser qu'à l'échelle ultra-structurale il serait possible d'observer des différences entre toutes ces cellules.

On constate en fait que toutes ont le même aspect aussi bien chez le Lérot que chez le Cobaye.

Les seules petites variations concernent surtout l'aspect de l'ergastoplasme qui, chez le Lérot notamment, peut être plus ou moins vacuolisé.

L'existence de nombreuses images intermédiaires entre l'état peu ou très vacuolisé indique que ces différents aspects sont liés vraisemblablement à des stades de fonctionnement différents.

Les résultats que nous obtenons par la méthode de superposition, aussi bien chez le Lérot que chez le Cobaye, sont donc en faveur d'un type unique de cellules gonadotropes.

En comparant nos observations et celles effectuées sur d'autres mammifères, peut-on, à l'inverse de ce que nous avons écrit pour les cellules corticotropes, dire qu'il existe à l'échelle ultrastructurale une catégorie de cellule gonadotrope typique, observé chez de nombreuses espèces? Pour notre part, nous avons relevé entre les cellules gonadotropes du Lérot et du Cobaye, un certain nombre de points communs:

- les cellules sont presque toujours localisées près des capillaires
- la densité aux électrons du cytoplasme est semblable
- les granulations sont hétérogènes
- l'appareil de Golgi, de taille souvent importante, est formé de dictyosomes disposés de façon concentrique
- les mitochondries ont un aspect et une disposition semblable

Ces caractéristiques semblent de fait se retrouver dans de nombreuses espèces et correspondent le plus souvent aux cellules classiquement décrites comme élaboratrices de FSH: chez la Souris (Barnes, 1963), l'Homme (Van Lawzewitsch, 1972), les cervidés (Young et Chaplin, 1974), le Hamster (Deslex et coll, 1974), le Rat d'Iran (Stefan, 1976), les bovins (Dacheux et Dubois M.P., 1976).

L'ergastoplasme, par contre, semble pouvoir revêtir des aspects plus variables; assez souvent vacuolaire chez le Lérot, il a été décrit ainsi chez de nombreuses espèces alors que chez le Cobaye, cet aspect est peu fréquent. Il faut cependant être très prudent dans l'utilisation de l'apparence de l'ergastoplasme comme critère de reconnaissance.

	Forme, Taille situation de la cellule	Noyau	Granulations	Ergastoplasme	Golgi
COBAYE (immuno)	- allongée - variable - près des cap.	rond	2000 $\varnothing$ 2500 Å - grains hétérogènes	- moyennement développé - ss forme de saccules	grande taille (formé de plusieurs dic- tyosomes) circulaire
LEROT (immuno)	- forme variable - taille variable - près des cap.	souvent encoché	1800 $\varnothing$ 2000 Å - grains hétérogènes	plus ou moins développé ss forme de saccules ou vacuolisé	- grande taille (formé de plusieurs circulaire)
RAT (ind)	- FSH rondes près des cap.	rond	1800 $\varnothing$ 2000 Å 7000 $\varnothing$ 10000 Å	plus ou moins développé (parfois vacuolisé)	très développé (encercle le noyau)
	- LH grandes près des cap.	rond	1000 $\varnothing$ 2350 Å	peu développé	peu développé
RAT (immuno)	- forme variable près des cap.	rond	type A 2000 $\varnothing$ 2500 Å 7000 $\varnothing$ 10000 Å type B 2000 $\varnothing$ 2500 Å	- moyennement développé souvent vacuolisé	grande taille
HAMSTER (ind)	- FSH rondes près des cap.	rond	1000 $\varnothing$ 3200 Å densité variable	plus ou moins développé (parfois vacuolisé)	plus ou moins développé circulaire
	- LH rondes	rond	1200 $\varnothing$ 2200 Å densité variable	saccules légèrement dilatés	plus ou moins développé
BOVINS (ind)	- FSH grandes et ovales près des cap.	-	2200 $\varnothing$ 2500 Å	- bien développé - lamellaire ou vacuolisé	grande taille
	- LH taille moyenne	noyau excentré	2500 $\varnothing$ 3000 Å	vacuolisé	moyennement développé
BOVINS (immuno)	- rondes ou ovales	de grande taille	2500 $\varnothing$ 4000 Å (plus quelques granula- tions de plus grande taille)	- ss forme de saccules	moyennement développé
RENARD (immuno)	-	-	2000 $\varnothing$ 3000 Å	plus ou moins vacuolisé	
HOMME (ind)	- FSH grande cellule	irrégulier	1500 $\varnothing$ 3000 Å	- saccules dilatés	très développé
	- LH petite	rond	1000 $\varnothing$ 2500 Å	- saccules parallèles	-

TABLEAU N° VI

COMPARAISON DE QUELQUES CARACTÉRISTIQUES ULTRASTRUCTURALES DÉCRITES DANS  
LES CELLULES GONADOTROPES DE MAMMIFÈRES, INDIVIDUALISÉES SOIT PAR DES  
TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES (IMMUNO) OU INDIRECTES (IND).



Nous n'avons jamais observé comme chez le Rat l'existence de deux types de granulations dans la même cellule.

Discussion concernant le marquage sur coupes ultrafines chez le Lérot

Quel que soit l'anticorps utilisé (anti LH ovine, anti LH  $\beta$  porcine, anti FSH  $\beta$  de Rat), nous avons obtenu des réactions positives sur toutes les granulations mais avec des intensités variables. La FSH  $\beta$  ainsi que la LH et la LH  $\beta$  se situeraient donc dans les mêmes granulations.

Aucun marquage significatif n'a pu être observé ailleurs que sur les granulations, ce qui n'est pas en faveur de l'existence d'un pool hormonal extragranulaire.

Aucune réaction positive n'a pu être décelée sur des granulations d'un autre type cellulaire, notamment sur celles des cellules corticotropes. Moriarty et Garner (1977) ont en effet décrit avec de l'anti FSH  $\beta$  de Rat (fourni également par le Docteur Parlow - N.I.H) un marquage sur les granulations de certaines cellules corticotropes.

Discussion concernant le marquage sur coupes ultrafines et au cryostat chez le Cobaye

L'utilisation de l'anti LH  $\beta$  porcine a permis d'obtenir sur coupes ultrafines, une réaction positive sur toutes les granulations d'un même type cellulaire.

Comme chez le Lérot, aucun marquage n'a pu être observé dans le cytoplasme. Dans les quelques cas où nous avons pu distinguer de façon certaine l'appareil de Golgi et l'ergastoplasme, nous n'avons donc décelé aucune réaction positive à leur niveau.

Dacheux et Dubois M.P. (1976) ont observé chez les bovins, un marquage sur les granulations en voie de formation contenues dans les saccules golgiens. Pour notre part, de telles granulations ont rarement été vues, même en microscopie

classique. Par contre, de très nombreuses granulations sont situées à proximité de l'appareil de Golgi. Celles-ci apparaissent alors marquées comme les autres granulations.

En utilisant la technique au cryostat, nous obtenons un marquage sur les granulations, mais également une très légère réaction positive aussi bien dans le cytoplasme qu'au niveau des membranes de l'ergastoplasme. Ces observations sont comparables à celles de Tougard et coll (1973) sur les cellules gonadotropes du Rat mais aussi à celles de Tixier-Vidal et coll (1976) sur les cellules gonadotropes en culture. Dans ces travaux, aucun marquage n'a été noté dans les saccules golgiens ou ergastoplasmiques.

En fonction de la technique utilisée, on constate donc des différences dans la localisation des sites antigéniques. Ceci est vrai non seulement dans nos observations mais aussi pour celles effectuées sur l'adénohypophyse du Rat par Tougard et coll (1973) d'une part, et par Moriarty (1976) d'autre part:

- les premiers ont en effet un marquage cytoplasmique alors que Moriarty n'en montre pas.

- Tougard et coll décrivent un marquage intense sur les petites granulations des cellules gonadotropes alors que Moriarty l'obtient sur les plus grosses granulations.

Ces différences au niveau du cytoplasme peuvent s'expliquer au moins de deux façons:

- 1er: le marquage cytoplasmique est un artefact et ceci est possible au moins en périphérie de la cellule.

- 2ème: ce marquage n'est pas un artefact et dans ce cas, il faut admettre que le fait d'inclure dans de l'araldite modifie ou détruit les sites antigéniques situés dans le cytoplasme.

## CONCLUSIONS

L'observation à l'échelle ultrastructurale des cellules marquées par différents antigonadotropines permet de constater que toutes les cellules ainsi individualisées sont semblables à l'intérieur d'une même espèce (Cobaye et Lérot). D'autre part toutes les granulations présentent des réactions positives.

Ces résultats semblent indiquer:

- qu'il n'existe qu'un seul type cellulaire gonadotrope
- que la FSH et la LH sont contenues dans une même granulation.

Par ailleurs, à l'inverse de ce que nous avons pu montrer pour les cellules corticotropes, il existe pour les cellules gonadotropes du Cobaye et du Lérot de nombreux points de ressemblance qui sont également communs à un très grand nombre d'espèces.

Il paraît alors possible d'établir des critères morphologiques permettant d'individualiser de façon presque certaine les cellules gonadotropes de divers mammifères.

LES CELLULES THYREOTROPES

A/ Etat des connaissances concernant la structure  
fine de ce type cellulaire au début de nos travaux

Farquhar et Rinehart (1954b), les premiers, ont décrit les cellules thyroïdotropes de l'adénohypophyse du Rat à l'échelle ultrastructurale en se basant

- d'une part sur certains critères établis en microscopie photonique par Purves et Griesbach (1951a, b)
- d'autre part sur l'observation en microscopie électronique, de cellules dites de thyroïdectomie.

Cette étude a été reprise chez la Souris par Barnes (1962,1963), encore chez le Rat par Kurosumi et Oota (1966).

Les conclusions de ces différents auteurs sont assez semblables; les cellules thyroïdotropes sont alors décrites comme des cellules de forme polygonale, rarement situées près des capillaires, contenant des granulations peu denses aux électrons dont le diamètre est compris entre 1.000 et 1.500 Å.

Cependant, pour Herlant et Klatersky (1963), ainsi que pour Rennels et Shiino (1968), les cellules ainsi caractérisées sont plutôt des cellules élaboratrices d'ACTH.

Par ailleurs, un certain nombre d'auteurs mettent en doute la relation directe entre les cellules de thyroïdectomie et les cellules thyroïdotropes (Aplington et Tedrow, 1968; Dingemans, 1969; Harumiya, 1972; Yoshimura et coll, 1973). En effet, les cellules thyroïdotropes sont nettement moins nombreuses que les cellules de thyroïdectomie, leur topographie est également différente et enfin leur apparition est suivie d'une nette diminution des cellules acidophiles.

Pour d'autres auteurs, (Pelletier, 1973; Pelletier et Puviani, 1973; Cuerdo-Rocha et Zambrano, 1974a,b) si la

relation entre cellule thyroïdrotrope et cellule de thyroïdectomie ne fait pas de doute, il existe des différences très importantes dans leur morphologie:

- les cellules de thyroïdectomie sont très vacuolisées
- elles ne renferment plus de grains de sécrétion classiques
- il en apparaît par contre dans les saccules ergastoplasmiques
- il n'y a pas d'images d'exocytose

Parallèlement, le taux sérique de TSH est toujours élevé.

Il paraît donc difficile d'établir des critères morphologiques de reconnaissance des cellules thyroïdrotropes normales à partir des cellules de thyroïdectomie.

#### B/ Etat des travaux de nature immunohistochimique en microscopie photonique

Les premières observations en immunofluorescence sont dûes à Greenspan et Hargadine (1965), mais les résultats furent peu démonstratifs.

Les travaux vont alors être repris chez le Rat par Nakane (1968; 1970) mais surtout par Baker (1971), Baker et Yu (1971), Baker et coll (1972).

D'autres espèces seront également étudiées, notamment les bovins, ovins et porcins (Dubois M.P., 1971b), l'Homme (Robyn, 1971; Robyn et coll, 1971; Phifer et Spicer, 1973).

Ces différents auteurs ont utilisé de l'anti TSH totale d'origine bovine, ovine ou humaine. Or, comme pour les gonadotropines, Liao et Pierce (1970), Hennen et coll (1971), ont montré l'existence dans la molécule de TSH de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . En même temps, ils démontrent l'analogie de structure entre les sous-unités  $\alpha$  de TSH et de LH. Ainsi s'explique

l'obtention d'une réaction croisée entre l'anti TSH totale et les gonadotropines.

La majorité des auteurs ont alors saturé l'anti TSH soit avec de l'H.C.G. (Robyn et coll, 1971; Phifer et Spicer, 1973), soit avec de la LH (Dubois M.P., 1971b). A l'inverse de ce qui s'était produit pour les gonadotropines, il semble que les résultats observés soient assez constants et que l'anti TSH ainsi obtenu soit spécifique de la sous-unité  $\beta$ . Un seul type cellulaire a alors été mis en évidence.

Une étude a cependant été effectuée directement avec de l'anti TSH  $\beta$  par Baker et coll (1971) et les résultats ont été semblables à ceux obtenus en utilisant l'anti TSH saturé.

Ces techniques ont apporté assez peu d'éléments nouveaux à l'échelle de la microscopie photonique. Elles ont surtout confirmé la nature thyroïdrotrope des cellules ayant une affinité pour le bleu alcian à bas pH et pour la Thionine paraldéhyde. Par contre, elles ont permis à Baker et Yu (1971) de montrer que les cellules de thyroïdectomie dérivait des cellules thyroïdotropes.

#### C/ Résultats obtenus par l'application des techniques immunocytochimiques à la microscopie électronique

Là encore, les premières observations ont été effectuées sur le Rat par Nakane (1970) qui utilise la même technique que pour l'étude des types cellulaires précédents. Les résultats qu'il obtient permettent surtout de caractériser la forme et la taille des cellules (grandes et polygonales) ainsi que le diamètre des granulations (1.500 à 2.000 Å). Pour Nakane, il apparaît ainsi que "les différences entre les cellules thyroïdotropes et les cellules corticotropes sont très petites à l'échelle ultrastructurale et que sans l'aide de l'immunocytochimie, cette distinction est très difficile à faire".

En raison de la similitude des sous-unités  $\alpha$  de la LH ovine et de la TSH ovine, Tougard et coll (1973) ont pu décrire

en même temps que les cellules gonadotropes, les cellules thyroïdiques du Rat. Celles-ci sont semblables à celles caractérisées par Nakane: grande taille, forme polygonale, petit diamètre des granulations.

Plus récemment, Moriarty et Tobin (1976), utilisant la technique au P.A.P., ont individualisé toujours chez le Rat, ces mêmes cellules en employant de l'anti TSH  $\beta$  bovine. Les résultats obtenus sont comparables à ceux des auteurs précédents, mais la possibilité de confondre parfois ce type cellulaire avec certaines cellules gonadotropes est retenue.

Parallèlement, Moriarty et Tobin dans ce même article, décrivent les cellules thyroïdiques de l'adénohypophyse humaine: celles-ci par contre, ne présentent pas de forme caractéristique et les granulations qu'elles contiennent ont une taille légèrement supérieure à celle observée chez le Rat. (1.500 à 3.000 Å de diamètre).

Les cellules thyroïdiques du Cobaye n'ont jamais fait l'objet de travaux à l'échelle ultrastructurale.

Les seules observations précises se rapportant à ce type cellulaire chez cette espèce ont été effectuées en microscopie photonique par D'Angelo (1953) et Tramu (1969).

Dans une première étape, nous avons donc individualisé ces cellules thyroïdiques, puis dans une deuxième étape, nous avons tenté de localiser les sites antigéniques de la TSH.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Beauvillain et coll, 1976).

## D/ Recherches personnelles

### 1 - Points particuliers sur les méthodes employées

L'étude a été faite exclusivement sur le Cobaye par les trois méthodes déjà décrites.

#### Superposition:

- Fixateurs: - glutaraldéhyde-paraformaldéhyde suivi de tétroxyde d'osmium
- glutaraldéhyde-paraformaldéhyde seul
- P.A.F. suivi de tétroxyde d'osmium
- P.A.F. seul

#### Technique au P.A.P. et cryostat:

Une fixation au P.A.F. seul a été utilisée.

#### Anticorps:

L'anti TSH bovine (N.I.H., TSH B2) saturé avec de la LH bovine (N.I.H., LH B5) a toujours été employé.

Dans le but de vérifier la non-existence d'une réaction croisée entre l'anti TSH et les gonadotropines, nous avons comparé sur des coupes semi-fines adjacentes, le marquage avec l'anti TSH et l'anti LH $\beta$  porcine.

### 2 - Résultats

#### a/ Technique des superpositions

##### - Coupes semi-fines

Les résultats obtenus avec les différents fixateurs sur coupes semi-fines peuvent être résumés dans le tableau n°VII

Planche XVIII

Superposition d'observations de coupes semi-fines et ultrafine  
(Cobaye)

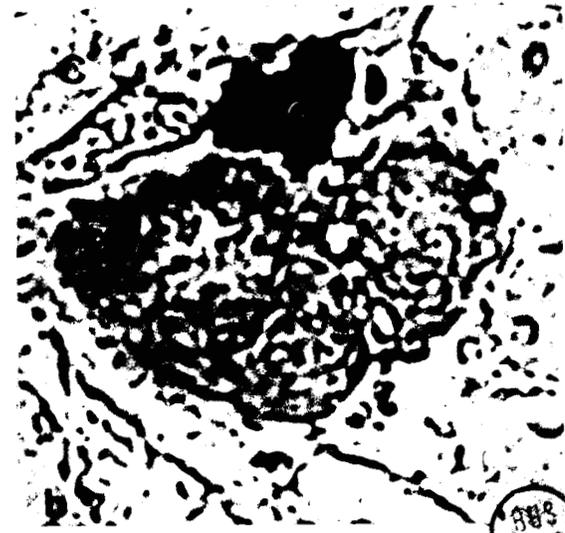
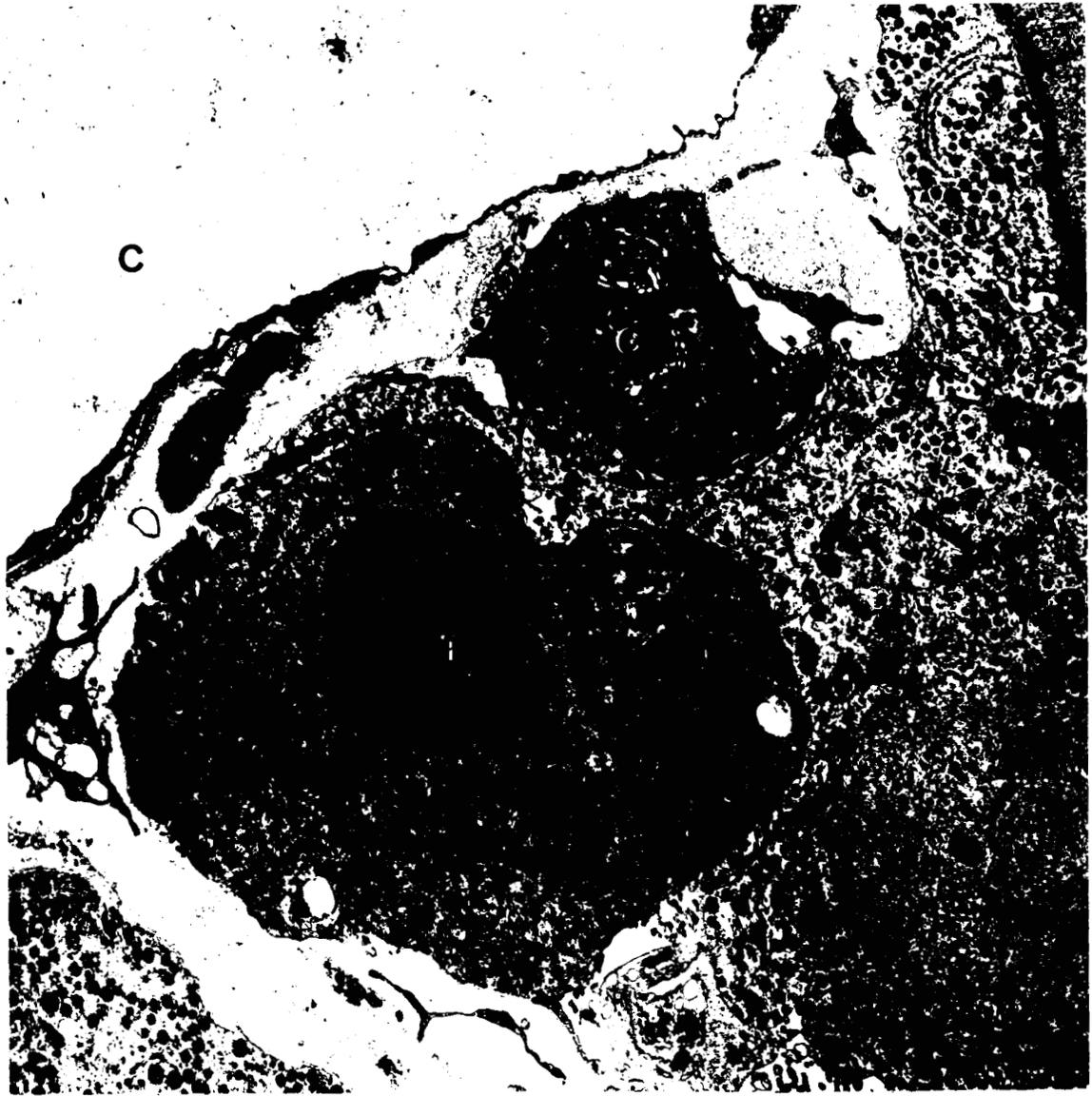
Sur la première coupe semi-fine (fig.a) une cellule est mise en évidence grâce à un anticorps anti TSH bovin saturé avec de la LH.(T)

Sur la deuxième coupe semi-fine adjacente (fig.b) on peut observer le marquage obtenu avec l'anti LH  $\beta$  porcine (G). On peut ainsi constater qu'il n'y a pas de réaction croisée et que l'anti TSH saturé ne met bien en évidence que les cellules thyroïdiques.

Sur la fig. c, on retrouve d'une part la cellule thyroïdique (T) et d'autre part la fraction de cellule gonadotrope. C: capillaire

G: x 10000





888  
LILLE



Planche XIX

LILLE

Agrandissement de l'encadré de la figure précédente.

L'appareil de Golgi est constitué de plusieurs dictyosomes et l'ergastoplasme de saccules plus ou moins dilatés. Le hyaloplasme est dense aux électrons. Les granulations ont des aspects très variés.

G: x30000

Fixateurs	Gluta-Formol	Gluta-Formol	P.A.F.	P.A.F
	OsO4		OsO4	
Anti TSH	-	-	+	+

Tableau VII: Résultats obtenus avec l'anti TSH bovine avec différents fixateurs.

Il apparaît ainsi qu'aucun marquage n'a pu être décelé en utilisant une fixation à base de glutaraldéhyde alors que les fixations à base d'acide picrique et de paraformaldéhyde permettent de voir sur les coupes semi-fines des réactions comparables à celles observées sur des tissus fixés au Bouin Hollande Herlant et inclus dans de la paraffine.

La réaction positive intéresse des cellules généralement de grande taille, de forme polygonale, localisées au milieu de la région antérieure et médiane de l'hypophyse. Elles sont situées dans la plupart des cas près des capillaires. (Pl. XVIII).

La comparaison effectuée avec les coupes voisines traitées avec de l'anti LH  $\beta$  porcine mais aussi avec de l'anti- $\alpha$ -17-39 ACTH permet de constater que le marquage obtenu avec de l'anti TSH bovine est bien spécifique d'un type cellulaire. Le nombre des cellules immunoréactives est d'ailleurs nettement supérieur lorsque nous utilisons l'anti LH  $\beta$  porcine ou l'anti- $\alpha$ -17-39 ACTH comme anticorps spécifique.

#### - Coupes ultrafines

Toutes les cellules individualisées sur les coupes semi-fines et retrouvées sur les coupes ultrafines adjacentes présentent des caractéristiques communes.

Elles sont notamment plus sombres que les cellules voisines. (Pl. XVIII)

L'ergastoplasme est constitué soit de saccules sans arrangement particulier, soit de petites vacuoles dilatées (Pl. XXa, b).

Planche XX

Différents aspects de la cellule thyroïdienne du Cobaye

fig. a; Certaines granulations renferment un grain dense et homogène alors que d'autres sont pratiquement vides et ne contiennent qu'un petit point sombre (flèches). Entre ces deux extrêmes, il existe des formes intermédiaires.

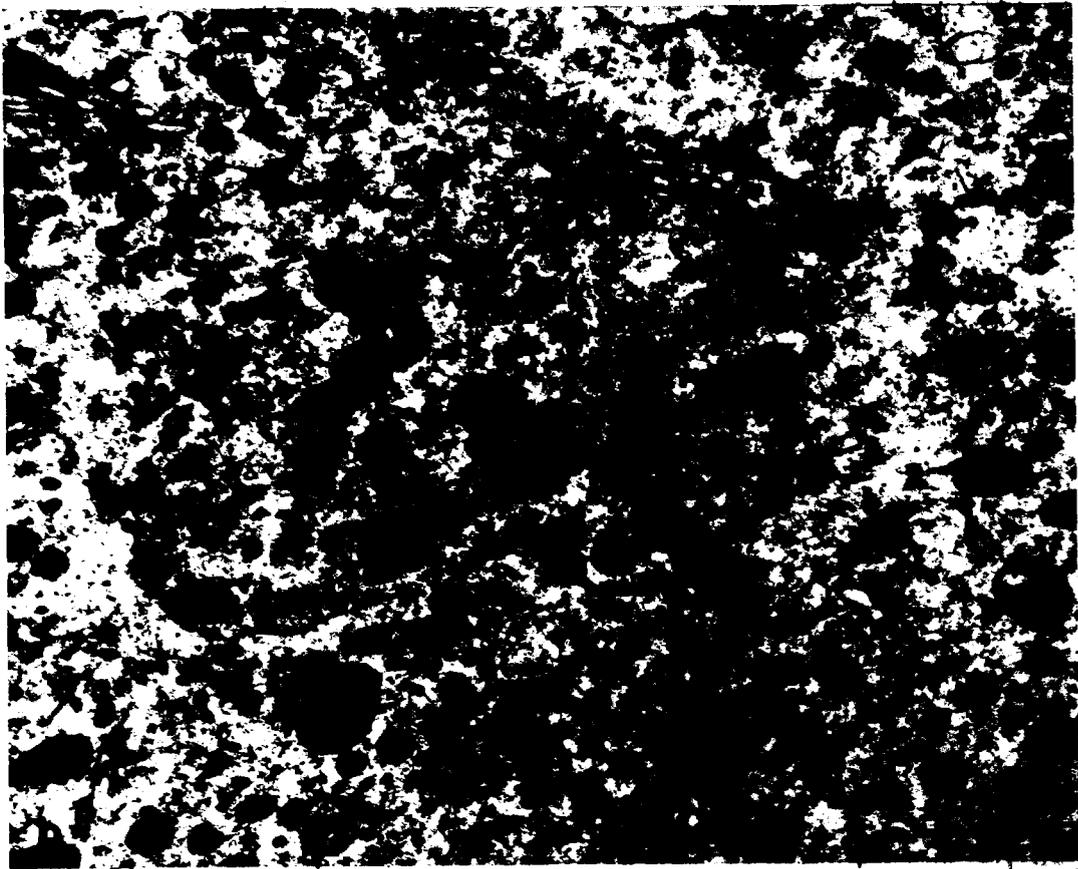
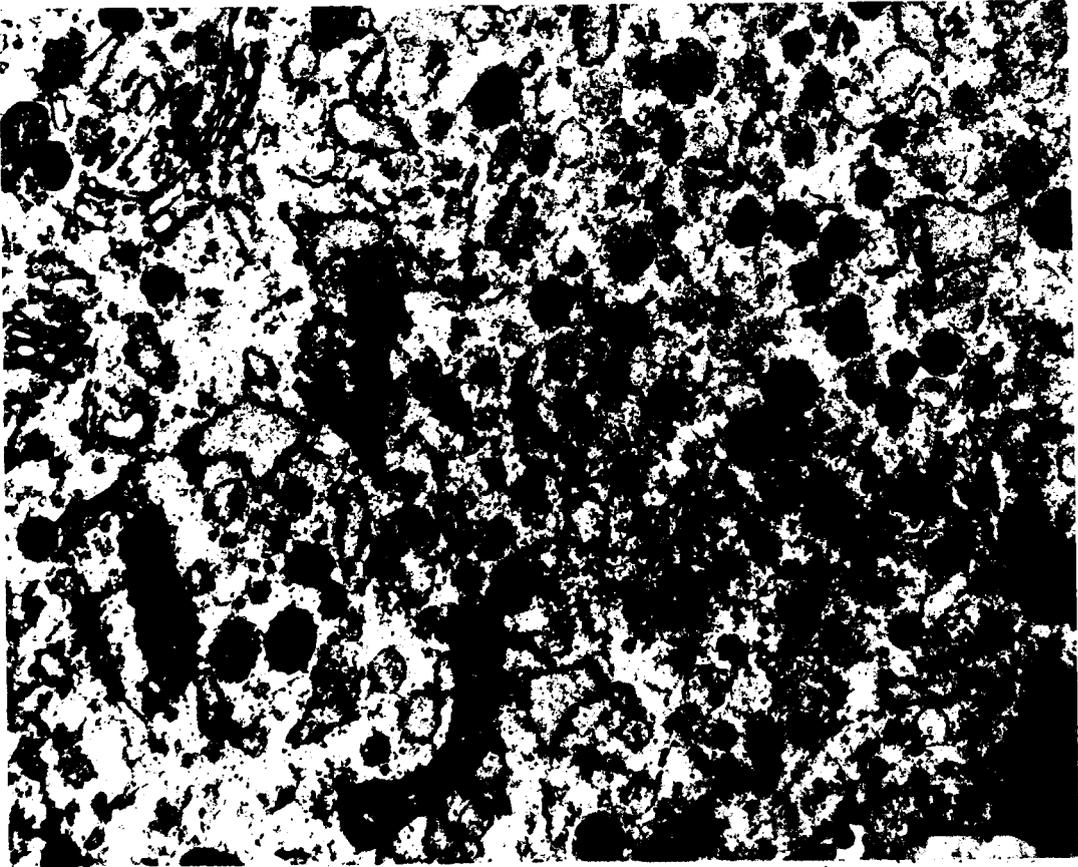
L'ergastoplasme est constitué de saccules dilatés.

G: x37000

fig. b; Dans la région de l'appareil de Golgi, les granulations sont presque toujours denses et homogènes. Les saccules ergastoplasmiques sont ici moins dilatés.

G: x37000





LILLE

L'appareil de Golgi est plus ou moins développé d'une cellule à l'autre, mais il apparaît presque toujours constitué de plusieurs dictyosomes à saccules aplatis (Pl.XIX). Ces dictyosomes sont très souvent situés les uns à côté des autres sur une même ligne.

Les mitochondries sont de petite taille et ont une matrice très dense aux électrons. Elles sont réparties de façon uniforme dans tout le cytoplasme (Pl.XIX).

Les ribosomes libres sont nombreux.

Les noyaux ne sont généralement pas volumineux (environ 3 à 4  $\mu$ ), mais ils renferment par contre un nucléole de grande taille.

Ces cellules contiennent des granulations nombreuses dont le diamètre se situe entre 1.500 et 2.000 Å. L'aspect de ces granulations est très variable à l'intérieur d'une même cellule. Certaines ont un grain central très opaque, bien séparé de la membrane qui l'entoure par un espace clair. Cet aspect, le moins fréquent, est observé essentiellement à proximité de l'appareil de Golgi (Pl.XX a,b). La plupart des autres granulations sont nettement moins denses aux électrons mais il subsiste cependant très souvent une zone plus sombre située en périphérie des grains. En plus, on peut individualiser, entre les granulations, des vésicules vides ou ne renfermant qu'un matériel très peu contrasté. Parmi celles-ci, certaines présentent la même petite zone dense aux électrons observée dans les granulations précédemment décrites (Pl. XX a).

De façon générale, on trouve des granulations sécrétoires dans tout le cytoplasme mais assez fréquemment, on constate en plus une polarisation de celles-ci dans la région cytoplasmique la plus proche du capillaire.

#### b/ Technique immunocytochimique sur coupes ultrafines

Un seul type de cellule, très souvent de grande taille, présente des granulations marquées. Celles-ci ont un diamètre

Planche XXI

Cellules marquées par l'anti TSH bovin saturé avec de la LH bovine;  
(technique au P.A.P.; Cobaye)

Toutes les granulations sont marquées.

fig. a; L'ergastoplasme est constitué de saccules dilatés (flèche) mais on n'observe pas de molécules de P.A.P. à l'intérieur de ceux-ci. On peut constater qu'il existe fréquemment une plus grande concentration des granulations vers le capillaire.

G: x13000

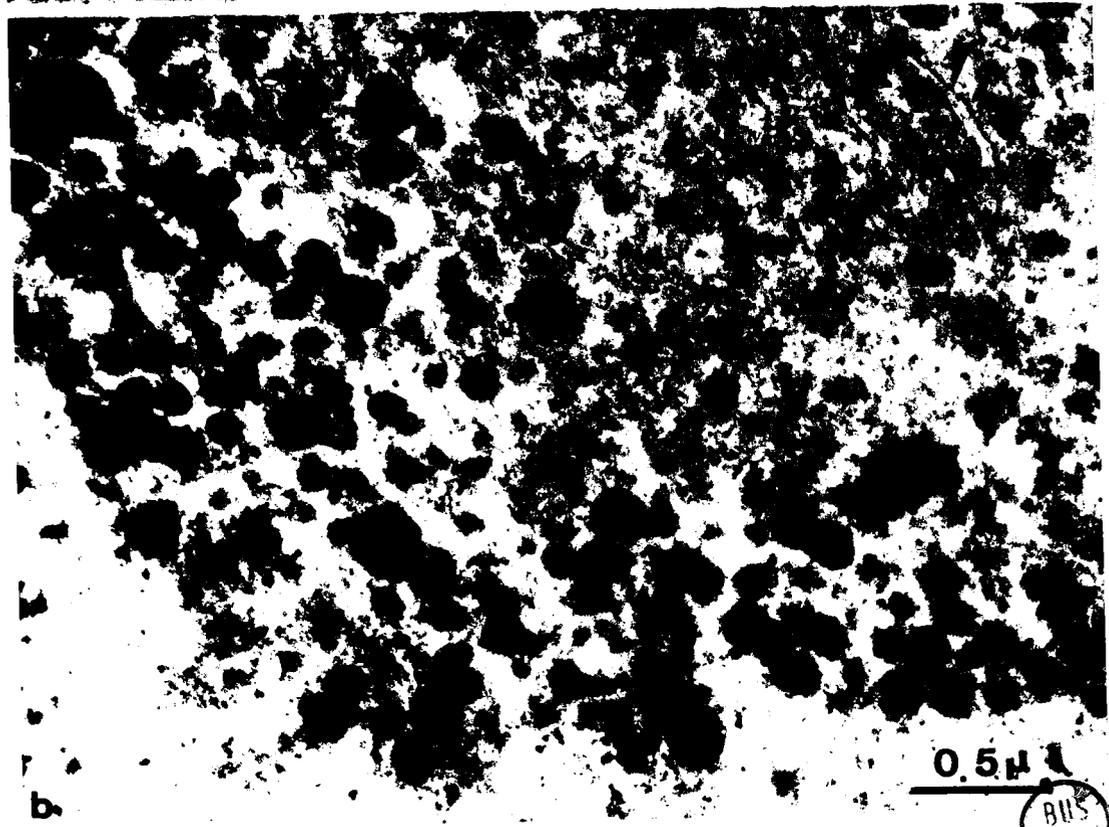
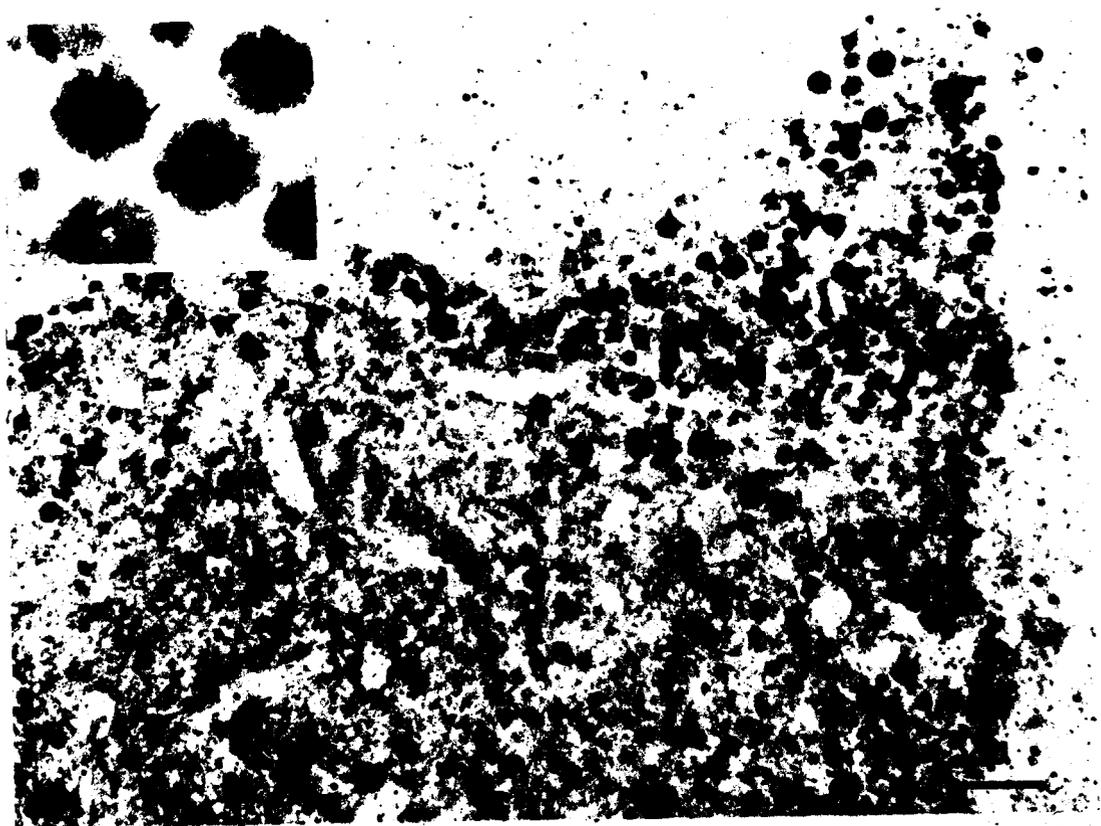
fig. b; On retrouve le marquage sur toutes les granulations d'une cellule thyroïdienne dont l'ergastoplasme se présente plus sous la forme de saccules non dilatés (flèche). L'ensemble de la granulation est opaque aux électrons.

G: x38000



Encadré; On peut observer les molécules de P.A.P.

G: x90000



b.

BILL'S LILLE

de 1.500 à 2.000 Å, donc comparable à celui des granulations observées dans les cellules individualisées par la technique précédente (Pl. XXI a, b).

A des grossissements plus élevés, on constate que des molécules de P.A.P. sont réparties de façon homogène sur toutes les granulations. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence, au niveau du grain, une différence de marquage pouvant correspondre aux différences de densité vues en microscopie électronique classique.

En dehors des granulations, aucune réaction significative n'a été décelée. Même dans les cas où nous avons pu distinguer de façon certaine les vacuoles ou les saccules ergastoplasmiques, il est apparu très nettement que leur contenu ne renfermait pas de molécules de P.A.P. (Pl. XXI a,b).

#### c/ Technique immunocytochimique sur coupes au cryostat

Sur les coupes de 20 $\mu$ , on a pu vérifier que les cellules marquées avaient la même répartition dans l'hypophyse que les cellules individualisées sur coupes semi-fines. Aucun autre type cellulaire ne semble positif en microscopie photonique.

Au microscope électronique, les cellules sont toutes semblables et sont essentiellement caractérisées par l'aspect de l'ergastoplasme et des granulations:

- l'ergastoplasme est franchement de type vacuolaire et semble avoir subi des dilatations au moment de la congélation (Pl. XXIIa).

- les granulations ont un diamètre compris entre 1.500 et 2.000 Å mais ne contiennent qu'un petit grain dense marqué dont le diamètre ne dépasse pas 800 Å (Pl. XXIIb).

Il semble qu'il y ait eu soit une rétraction de l'ensemble du contenu de la granulation, soit une perte du contenu de faible densité observé en microscopie électronique classique.

Planche XXII

Cellules marquées par l'anti TSH bovin saturé avec LH.  
(technique à congélation; Cobaye)

fig. a; Un seul type cellulaire est nettement marqué. L'ergastoplasme est essentiellement de type vacuolaire. Ni le noyau, ni la matrice mitochondriale (m) ne présentent de réaction positive.

G: x11500

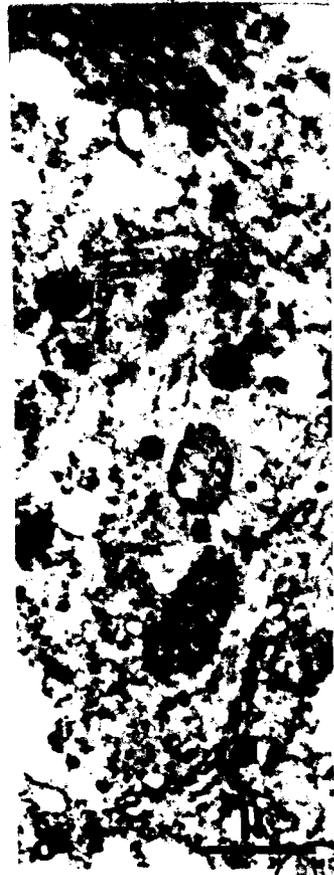
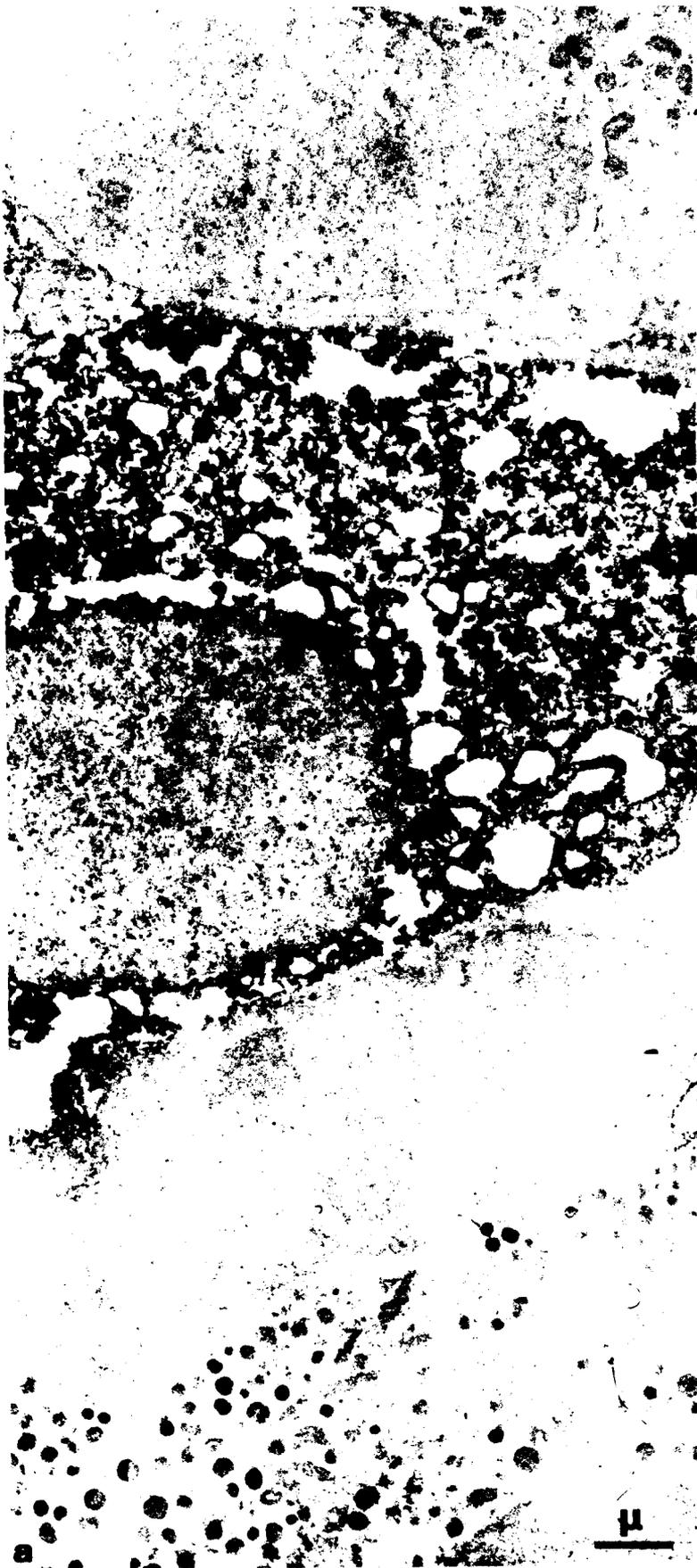
fig. b; Au sein des granulations, seul un petit grain souvent excentré est nettement marqué. Le contenu des vacuoles ergastoplasmiques est toujours négatif mais les membranes sont très contrastées. On peut également constater que dans le cytoplasme il existe aussi une légère réaction positive.

G: x43000

fig. c; Dans les saccules de l'appareil de Golgi (G) aucun marquage n'est visible. m: mitochondries

G: x16000





875  
LILLE

Dans cette dernière hypothèse, les granulations ne contiendraient plus alors que la partie très dense qui serait fortement immuno-réactive

A côté de ce marquage très localisé, on peut observer une réaction positive beaucoup plus diffuse dans l'ensemble du cytoplasme. Celle-ci n'existe pas dans les cellules voisines.

Les membranes de l'ergastoplasme présentent également une forte augmentation de densité aux électrons. (Pl. XXIIb)

Cependant dans quelques cas, les membranes mitochondriales externes peuvent être légèrement plus contrastées.

Par contre le noyau et la matrice des mitochondries sont toujours négatifs. Dans les saccules golgiens nous n'avons jamais observé de réactions positives. De même, nous n'avons jamais pu distinguer de marquage à l'intérieur des vacuoles ergastoplasmiques (Pl. XXIIb, c).

### 3 - Discussion

Nous avons obtenu avec les trois techniques des réactions positives uniquement lorsqu'ont été utilisés des fixateurs dépourvus de glutaraldéhyde. Cette constatation concorde avec celle de Nakane (1970) et avec des observations préliminaires de Moriarty (1973).

Moriarty et Tobin (1976a) confirment la supériorité du P.A.F. pour préserver les sites antigéniques de la TSH, mais constatent par ailleurs (1976b) que dans les cellules de thyroïdectomie, certains sites antigéniques semblent mieux préservés après fixation au glutaraldéhyde à 1 p100.

Par contre, nous avons obtenu des résultats positifs après avoir utilisé le tétroxyde d'osmium alors que Nakane (1975) affirme que ce fixateur ne permet pas d'obtenir de marquage avec l'anti TSH sur l'adénohypophyse de Rat.

Ces résultats montrent par ailleurs qu'il existe une réaction croisée entre la TSH bovine et la TSH de Cobaye.

Les contrôles effectués indiquent que la réaction est bien dûe à l'anticorps. D'autre part, la comparaison avec le marquage obtenu avec l'anti LH $\beta$  porcine a prouvé que l'anti TSH bovine saturé ne croisait plus avec les gonadotropines du Cobaye.

Utilisant d'autres méthodes (thyroïdectomie ou coloration au bleu alcian), D'Angelo (1953) et Tramu (1969) avaient localisé à l'échelle du microscope photonique les cellules thyroïdotropes du Cobaye. Les résultats que nous avons à cette même échelle confirment cette localisation. Celle-ci semble d'ailleurs être assez semblable dans plusieurs espèces, notamment chez le Rat (Nakane, 1970; Baker, 1971), chez la Souris (Messier 1965).

Si l'on compare la structure fine des cellules thyroïdotropes du Cobaye avec celles d'autres espèces individualisées soit par des méthodes indirectes, soit avec des techniques immunocytochimiques, on constate que la taille des granulations varie peu à l'exception de l'Homme et des bovins où elles ont un plus gros diamètre (Moriarty et Tobin 1976 a, Mikami 1970).

Par contre, nous avons observé chez le Cobaye une grande variété dans l'aspect de ces granulations et ceci n'a pas été signalé par ailleurs. De même la densité importante du cytoplasme ne semble pas être une caractéristique générale des cellules thyroïdotropes.

Il faut cependant noter que ces particularités sont moins prononcées après une fixation glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium.

Pendant de nombreuses années, la distinction entre cellules corticotropes et thyroïdotropes n'a pas pu être effectuée de façon précise chez le Rat et il semble que dans les hypophyses d'animaux normaux la différence ne soit pas toujours très nette. Chez le Cobaye, il existe également un certain nombre de points communs entre ces deux types cellulaires: les granulations sont approximativement de même taille et nous avons vu que dans les

	Forme et aspect du cytoplasme	Noyau	Granulations	Ergastoplasme	Golgi
COBAYE (immuno)	- grande cellule - cytoplasme dense près des cap.	rond taille moyenne	$1500 < \varnothing < 2000 \text{ \AA}$ aspects variables (homogènes & hétérogènes) - vésicules vides	- moyennement développé sacculés plus ou moins dilatés	- moyennement développé (plusieurs dictyosomes)
RAT (immuno.ind)	- ovoïde ou anguleux - clair	rond	$\varnothing$ moyen = $1300 \text{ \AA}$ plusieurs rangées en denses	- sacculés dispersés dans le cytoplasme parfois vacuolisé	- peu développé
HAMSTER (ind)	- petite cellule polygonale	rond	$1200 < \varnothing < 1600 \text{ \AA}$ - rondes - denses	- peu développé	- peu développé
BOVINS (ind)	- grande cellule	irrégul. et de grande taille	$3000 < \varnothing < 4000 \text{ \AA}$ sphériques	- lamellaire - développé	- moyennement développé
HOMME (ind)	- taille variable loin des cap.	grande taille	$800 < \varnothing < 1500 \text{ \AA}$ - homogènes	- peu développé	- peu développé
HOMME (immuno)	- forme polyhé- drique		$\approx 2250 \text{ \AA}$	- non décrit	- non décrit

TABLEAU N° VIII

COMPARAISON DE QUELQUES CARACTÉRISTIQUES ULTRASTRUCTURALES DÉCRITES DANS LES CELLULES THYRÉOTROPES DE QUELQUES MAMMIFÈRES, INDIVIDUALISÉES SOIT PAR DES TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES (IMMUNO) OU INDIRECTES (IND)



cellules corticotropes il existait aussi des vésicules plus ou moins transparentes aux électrons. Ainsi s'explique qu'il est parfois difficile lorsque nous observons seulement une petite fraction de cellule d'affirmer si elle est de nature corticotrope ou de nature thyroïdienne. Par contre, sur les cellules entières, un certain nombre de critères peuvent être utilisés quel que soit le mode de fixation:

- la taille de la cellule et sa forme
- le nombre de granulations ainsi que leur répartition dans le cytoplasme
- la densité aux électrons du cytoplasme.

La possibilité de confusion évoquée par Moriarty (1973) entre cellule thyroïdienne et cellule gonadotrope chez le Rat est impossible en ce qui concerne le Cobaye.

#### Apport des techniques immunocytochimiques sur coupes ultrafines et coupes au cryostat

Les résultats que nous avons obtenus sur coupes ultrafines sont absolument semblables à ceux observés pour les cellules gonadotropes: le marquage se situe sur les granulations mais avec des intensités variables. On peut alors penser que les réactions moins importantes correspondent aux vésicules à contenu peu dense observées en microscopie électronique classique.

Il est apparu par contre impossible de retrouver l'hétérogénéité à l'intérieur d'une même granulation.

Aucun marquage significatif n'a pu être décelé dans le cytoplasme ni dans les saccules golgiens et ergastoplasmiques.

Sur les coupes au cryostat, la première chose que l'on peut constater, c'est que la congélation semble avoir provoqué quelques dilatations au niveau de l'ergastoplasme qui apparaît nettement plus vacuolaire que dans les descriptions précédentes.

Mais le plus important concerne la localisation des sites antigéniques. Là encore non seulement les granulations ont une réaction positive mais le cytoplasme et les membranes de l'ergastoplasme présentent également un marquage.

Comme pour les cellules gonadotropes on obtient donc une différence de localisation des sites antigéniques selon la technique utilisée. Pour ce type cellulaire, le marquage cytoplasmique est d'ailleurs nettement supérieur à celui des cellules gonadotropes.

L'aspect particulier des granulations après congélation peut faire penser qu'il s'est produit une diffusion des hormones expliquant alors la réaction positive dans le cytoplasme. De même, l'augmentation du contraste des membranes ergastoplasmiques doit être considérée avec prudence car dans certains cas on a noté aussi cette même augmentation sur la membrane mitochondriale externe.

Cependant, même si l'on considère qu'une partie au moins de ce marquage est un artefact, il est possible qu'une autre partie corresponde à la présence de sites antigéniques correctement localisés et non décelables par la technique au P.A.P. sur coupe ultrafine.

Quel que soit le protocole expérimental utilisé, l'absence d'un marquage à l'intérieur des saccules golgiens et ergastoplasmiques est constant dans les cellules thyrotropes normales.

Les résultats que nous avons obtenus sont encore comparables à ceux de Tougard et coll (1973) ainsi qu'à ceux de Moriarty et Tobin (1976a) concernant les cellules thyrotropes normales du Rat. D'une part Tougard et coll observent comme nous un marquage cytoplasmique lorsque la technique immunocytochimique est pratiquée avant l'inclusion. D'autre part, comme nous également, Moriarty et Tobin ne montrent pas de marquage cytoplasmique dans les cellules thyrotropes normales du Rat avec une technique au P.A.P. Par contre, ils remarquent aussi

de très nettes différences dans l'intensité des réactions d'une granulation à une autre.

#### CONCLUSION

Grâce aux techniques immunocytochimiques, nous avons pu caractériser à l'échelle ultrastructurale les cellules thyroïdotropes de l'adénohypophyse du Cobaye.

Un certain nombre de critères ont été établis, permettant de les différencier notamment des cellules corticotropes avec lesquelles elles présentent des points communs.

Peu d'observations ont été effectuées sur ce type cellulaire en microscopie électronique si bien qu'il est difficile de dégager des caractéristiques communes à l'ensemble des cellules thyroïdotropes.

Si nous avons retrouvé quelques similitudes chez le Cobaye et chez le Rat, il existe un certain nombre de différences. Il ne semble donc pas exister à l'échelle ultrastructurale un type de cellule thyroïdotope.

La présence d'hormone extragranulaire doit être envisagée avec beaucoup de prudence. Seuls les résultats obtenus sur les coupes au cryostat permettent de formuler cette hypothèse.

LES CELLULES A PROLACTINE

A/ Etat des connaissances concernant la  
structure fine de ce type cellulaire au début  
de nos travaux

L'observation d'adénohypophyse de femelles gestantes ainsi que de femelles lactantes séparées de leurs petits puis remises avec eux, a permis très tôt de constater en microscopie photonique que la sécrétion de prolactine était liée à l'activité de cellules acidophiles et plus particulièrement érythrosinophiles après une coloration au tétrachrome de Herlant.

Une revue complète de ces travaux a récemment été effectuée par Girod (1976).

Au microscope électronique, les premières descriptions concernant ce type cellulaire sont dues à Farquhar et Rinehart (1954a) qui observent chez le Rat castré un type cellulaire qu'ils présument être à prolactine.

Hedinger et Farquhar (1957), Lever et Peterson (1960), Hymer et coll (1961), Rennels (1962), Pasteels (1963), vont montrer que ce type cellulaire correspond bien aux cellules à prolactine du Rat.

D'autres espèces animales seront étudiées: la Souris (Barnes, 1963), la chauve-Souris (Herlant, 1964), le Lapin (Foster, 1971). Toutes les descriptions tendent à décrire les cellules à prolactine comme un type cellulaire facilement reconnaissable en raison essentiellement de l'aspect des granulations. Celles-ci sont en effet de très grande taille, (pouvant atteindre 7.000 Å de diamètre) et elles ont très souvent des formes irrégulières. Il est noté également qu'à l'intérieur d'une même cellule, à côté de ces grosses granulations peuvent être présentes aussi des granulations de taille plus petite. Par ailleurs, l'ergastoplasme de ces cellules est fréquemment organisé en sacs parallèles regroupés en périphérie de la cellule.

Sur la base de ces critères, un certain nombre d'auteurs ont par la suite décrit les cellules à prolactine de diverses espèces: chez le Hamster (Dekker, 1968; Deslex et coll, 1976), les bovins (Dubois M.P. et Cohéré, 1969; Mikami, 1970), les cervidés (Young et Chaplin, 1975), l'Homme (Von Lawzewitsch et coll, 1972).

Dans d'autres espèces cependant et notamment chez le Cobaye, ces images caractéristiques n'ont pas été retrouvées et les cellules à prolactine n'ont pas pu être individualisées.

#### B/ Etat des travaux de nature immunohistochimique en microscopie photonique

Les premiers travaux d'Emmart et coll (1963,1965) effectués en immunofluorescence avec de l'anti-prolactine ovine ont permis de confirmer la nature acidophile des cellules à prolactine du Rat.

Un grand nombre d'auteurs reprendront ces observations avec des anti-prolactines ovines, bovines, humaines et de Rat.

- chez le Rat: Shiino et Rennels, 1966; Baker et coll, 1969; Baker, 1970; Gersten et Baker, 1970

- chez les bovins, ovins et porcins: Rümke et Ladiges, 1965; Dubois M.P., 1968, 1969, 1971c; Nayak et coll, 1968; Weidner, 1972

- chez le Renard: Bugnon et coll, 1974b,c.

- chez le Singe: Herbert et Hayashida, 1970; Girod et Dubois M.P. 1976a,b.

- chez l'Homme: Breudstedt et coll, 1965; Beck, 1972; Pasteels et coll, 1972; Halmi et coll, 1975; Martin-Comin et Robyn, 1976.

Ces travaux ont confirmé que les cellules erythro-si-nophiles étaient bien marquées par les anticorps anti-prolactine.

D'autre part, alors que certaines observations effectuées sur des cellules en culture d'origine tumorale (clone GH3) ont révélé (Tashjian et coll, 1970) que les mêmes cellules pouvaient

être capable de sécréter à la fois de la STH et de la prolactine, Martin-Comin et Robin (1976) ont nettement démontré que dans des hypophyses de Rats normaux, les cellules réagissant avec l'anti-prolactine ne montraient aucune réaction avec l'anti STH.

Les cellules ne contiennent donc pas à la fois de la prolactine et de la STH.

Le nombre des cellules mises en évidence par l'anti-prolactine est souvent supérieur au nombre des cellules érythrocinophiles. Certaines cellules ont un stockage granulaire très faible et peuvent être vues en immunofluorescence alors qu'elles apparaissent chromophobes après des colorations signalétiques. Il en est de même dans le cas de la majorité des adénomes hypophysaires à prolactine qui ont été décrits comme des tumeurs chromophobes. Les travaux effectués sur les variations quantitatives des cellules à prolactine au cours de circonstances physiologiques particulières n'ont donc de véritable valeur que s'ils le sont à l'aide de techniques immunocytochimiques.

#### C/ Résultats obtenus par l'application des techniques immunocytochimiques à la microscopie électronique

Peu de travaux ont été effectués à l'échelle ultra-structurale en utilisant les techniques immunocytochimiques. Les premières observations, toujours effectuées sur l'adénohypophyse du Rat, sont dûes à Nakane (1970) puis à Kawarai et Nakane (1970). La réaction est obtenue cette fois sur coupe ultrafine après inclusion dans le méthacrylate, mais en utilisant la méthode indirecte classique. Ces auteurs confirment alors les résultats obtenus par Farquhar et Rinehart (1954a). Les cellules marquées sont en effet caractérisées par l'existence de grosses granulations de forme irrégulière et par un ergastoplasme très abondant de type lamellaire. Le marquage par l'anti-prolactine se situe essentiellement sur les granulations mais l'existence

de réactions positives au niveau des saccules de l'ergastoplasme est également signalée. Notons cependant que plus récemment, Nakane (1975) n'a pas confirmé cette observation.

Chez le Rat, une autre étude est due à Parsons et Erlandsen (1974) qui marquent aussi les cellules à prolactine directement sur les coupes ultrafines, mais en utilisant cette fois, la technique au P.A.P. Pour eux, seules les granulations présentent des molécules de P.A.P. alors qu'au niveau de l'ergastoplasme, elles n'ont pu être mises en évidence. Les granulations sécrétoires ainsi caractérisées sont aussi de forme irrégulière.

L'individualisation des cellules à prolactine à l'échelle ultrastructurale a également été effectuée dans l'adénohypophyse de Renard par la méthode des superpositions (Bugnon et coll, 1974). Cette observation est intéressante car pour la première fois, elle signale l'existence de cellules à prolactine dont l'aspect est différent de celui décrit classiquement; les granulations sont de petite taille et sont rondes.

Enfin, plus récemment, Dacheux et Dubois M.P. (1976) ont caractérisé les cellules à prolactine de l'hypophyse de bovins par la technique au P.A.P. sur coupe ultrafine. Ils constatent que les granulations de ces cellules sont rondes et ont une taille d'environ 3.000 Å. Par contre, il existe bien des cellules possédant de plus grosses granulations, mais ce ne sont pas des cellules à prolactine.

Ces deux études mettent donc en évidence qu'il n'existe pas un seul type de cellules à prolactine et qu'ainsi celui-ci doit être individualisé dans chaque espèce.

#### D/ Données récentes sur les cellules à prolactine

Les derniers travaux ont surtout été consacrés à l'étude de la synthèse de la prolactine. Il semble en effet que celle-ci soit d'abord synthétisée sous forme de pré-prolactine dont le poids moléculaire est légèrement supérieur à la véritable prolactine

(Maurer et coll, 1976; Maurer et Gorski, 1977); Cette pré-prolactine n'a aucun rapport avec ce qui a été décrit par Friesen et coll (1970), Rogol et Rosen (1974), Suh et Frantz (1974), Guyda (1975) comme "big prolactin" dont le poids moléculaire est au moins deux fois supérieur à la prolactine normale et qui semble être plutôt une forme dimère résultant peut-être de la liaison des peptides par les ponts disulfures (Maurer et coll, 1976).

Comme pour les autres types cellulaires, le but de notre travail a donc été, dans un premier temps, d'individualiser les cellules à prolactine de l'adénohypophyse du Cobaye par la technique des superpositions.

Dans un deuxième temps, nous avons encore essayé de localiser plus précisément les sites antigéniques dans la cellule elle-même.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Beauvillain et coll, 1977).

## E/ Recherches personnelles

### 1- Points particuliers sur les méthodes utilisées

Les travaux ont été effectués sur des adénohypophyses de Cobayes femelles à la fin du dioestrus. Cependant, pour la mise au point des techniques, des hypophyses de femelles lactantes ont été observées trois jours après la parturition.

Les fixateurs précédemment cités pour les autres types cellulaires ont été employés.

Pour la réaction immunocytochimique, deux types d'anticorps anti-prolactine ont été utilisés:

- l'anti-prolactine de Rat
- l'anti-prolactine ovine.

Ils ont été dilués:

- au 1/80<sup>e</sup> pour la technique des superpositions ainsi que pour celle au cryostat
- au 1/250<sup>e</sup> ou au 1/500<sup>e</sup> pour la technique au P.A.P. sur coupe ultrafine.

### 2- Résultats

#### a/ Technique des superpositions

##### *- Coupes semi-fines*

Des réactions positives ont été obtenues avec les deux types d'anticorps après double fixation P.A.F.-tétroxyde d'osmium. Par contre, après double fixation glutaraldéhyde-paraformaldéhyde suivi de tétroxyde d'osmium, nous n'avons jamais pu observer de marquage sur les coupes semi-fines.

Le nombre des cellules individualisées n'est pas très important (supérieur cependant à celui des cellules thyrotropes mais inférieur à celui des autres types cellulaires).

Les cellules sont réparties dans toute l'hypophyse.

Planche XXIII

Superposition d'observations de coupe semi-fine et de coupe ultrafine  
(Cobaye)

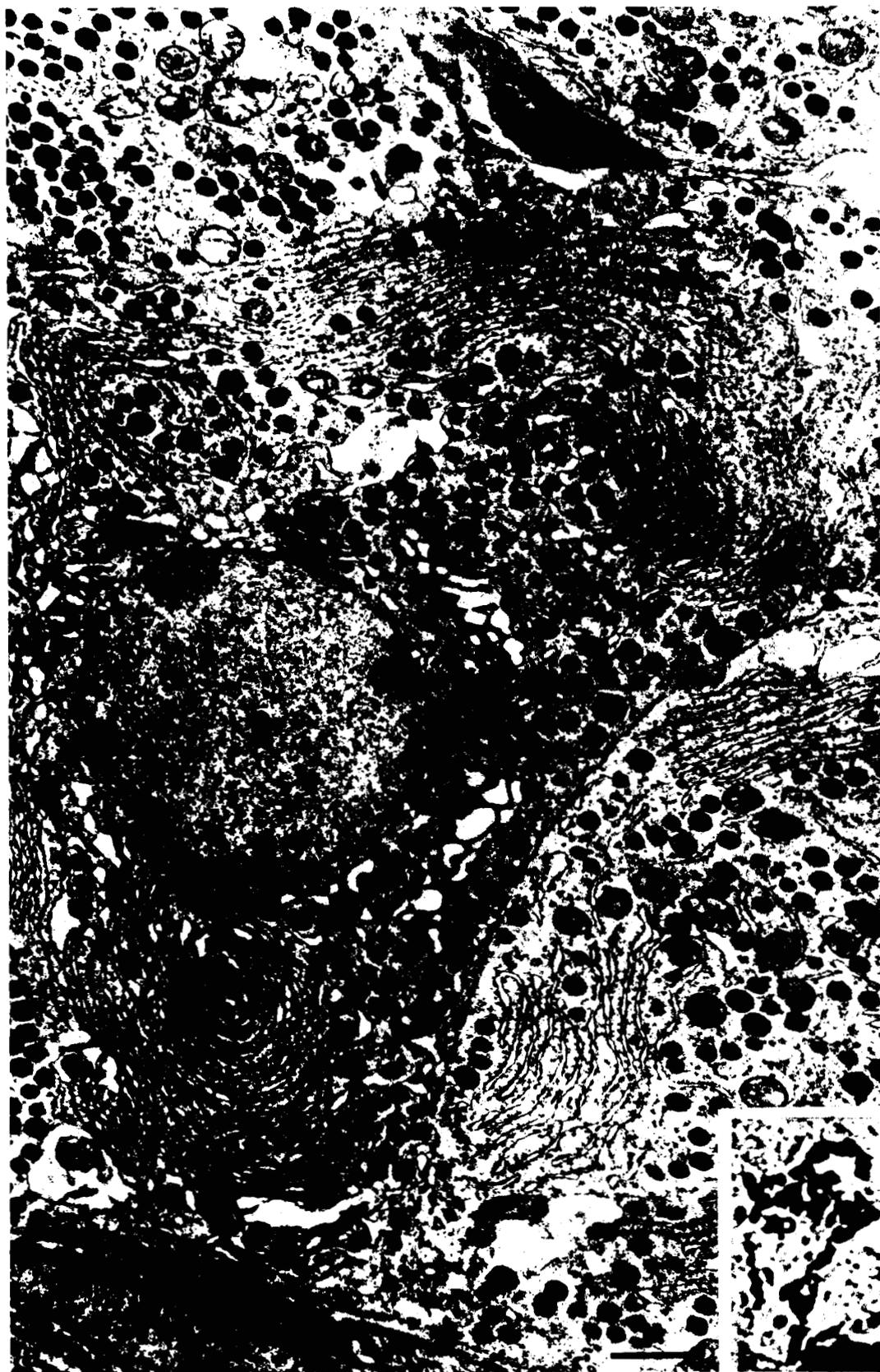
fig. b; Coupe semi-fine traitée avec l'antiprolactine ovine; la cellule marquée (P) est retrouvée sur la coupe ultrafine, fig. a.

Cette cellule correspond au type I: les granulations sont assez nombreuses et rondes dans l'ensemble. Quelques unes ont cependant une forme plus irrégulière (flèche). L'ergastoplasme est bien développé (ER)  
G: appareil de Golgi

On peut très bien voir que seules les régions où sont localisées les granulations apparaissent positives sur la coupe semi-fine.

G: x12000





511  
LILLE

Elles peuvent avoir une taille et une forme variable, mais elles sont plus fréquemment anguleuses et envoient des prolongements entre les cellules voisines. Ceux-ci sont cependant moins importants que ceux des cellules corticotropes. Ces cellules sont le plus souvent isolées; mais on peut aussi les trouver par petits groupes (2 à 4 cellules). Elles sont enfin situées de façon préférentielle à proximité des capillaires.

Ces résultats sont absolument comparables à ceux obtenus sur des coupes à la paraffine après fixation par le mélange de Carnoy. Nous n'avons jamais observé de réaction très satisfaisante après des fixations au Bouin Hollande Herlant alors que le Carnoy a par contre permis d'avoir d'excellents marquages.

#### *- Coupes ultrafines*

En observant un grand nombre de cellules à réaction positive, on constate qu'elles sont toutes caractérisées à l'échelle ultrastructurale par un cytoplasme clair et un noyau arrondi. Par contre, la quantité et la taille des granulations sont très variables d'une cellule à l'autre.

Deux types principaux peuvent être décrits, qui correspondent non pas, comme nous le verrons, à deux types cellulaires mais à des stades fonctionnels d'une même cellule.

#### - Type I (Pl. XXIII)

Les cellules ont des tailles diverses. Les granulations sécrétoires, réparties un peu partout dans le cytoplasme, présentent les caractéristiques suivantes:

- Elles ont un diamètre de 2.500 à 3.500 Å
- Elles sont dans la majorité des cas arrondies mais quelques unes d'entre elles, surtout situées dans la région golgienne peuvent présenter des formes irrégulières.
- Le grain central a une densité homogène aux électrons
- Il existe un espace clair entre ce dernier et la membrane qui l'entoure.

Planche XXIV

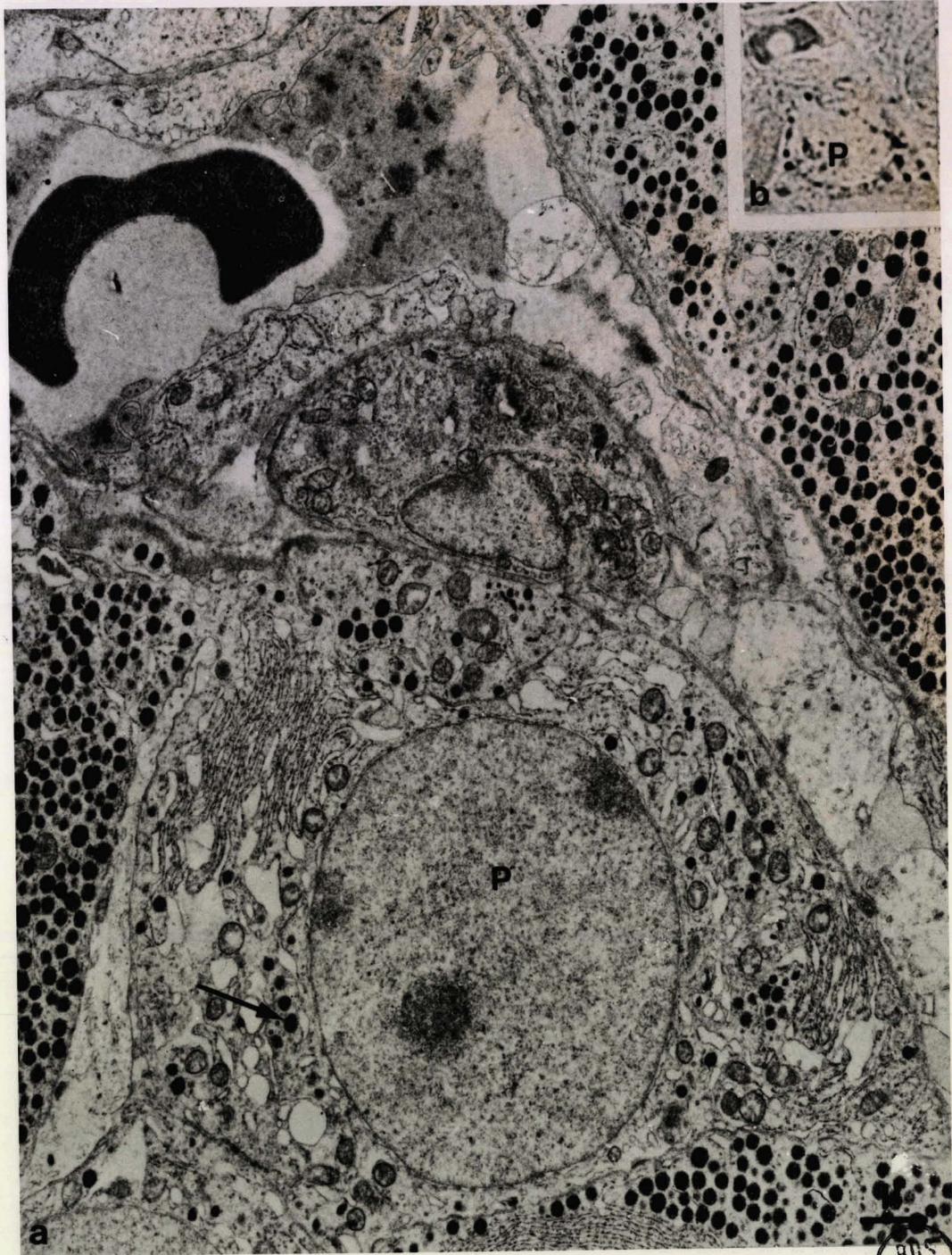
Superposition d'observations de coupes semi-fine et ultrafine  
(Cobaye)

Une cellule à prolactine (P) est marquée sur la coupe semi-fine  
par l'anti prolactine ovine (fig. b).

Cette même cellule est observée sur la coupe ultrafine adjacente  
(fig. a). Elle correspond au type II. Les granulations sont moins  
nombreuses et de plus petite taille.

G: x10000





BIS  
LILLE

A côté de ces caractéristiques relatives aux granulations, on constate que:

- l'ergastoplasme, organisé en sacs parallèles, est bien développé
- l'appareil de Golgi, souvent constitué de saccules dilatés, a une taille limitée. Il n'existe pas de région golgienne étendue comme on l'observe dans les cellules gonadotropes
- les mitochondries ont une matrice très claire
- les lysosomes et les dérivés lysosomiques sont semblables à ceux observés dans d'autres types cellulaires
- les nucléoles ont une taille normale

- Type II (Pl. XXIV)

Comme dans le type I, les cellules ont des tailles et des formes variables. Les différences observées entre les deux types de cellules sont les suivantes:

- le nombre de granulations est ici nettement moins important
- ces granulations ont un diamètre plus faible, compris entre 1.800 et 2.500 Å (les densités aux électrons et les formes sont identiques).
- l'ergastoplasme est moins développé mais il a par contre un aspect nettement plus vacuolaire.
- l'appareil de Golgi est semblable dans les deux types cellulaires.

Nous avons pu observer des formes intermédiaires entre ces types I et II.

Lors de la mise au point de la technique, les cellules à prolactine d'hypophyses de Cobayes en lactation ont été individualisées de la même façon. Nous avons alors constaté que la plupart des cellules ressemblaient plutôt au type II qu'au type I (Pl. XXV). Le nombre des granulations est en effet peu important et nous avons même vu des cellules de grande

Planche XXV

Superposition d'observations de coupes semi-fine et ultrafine.  
Adénohypophyse de Cobaye lactante.

Deux cellules apparaissent bien marquées (1 et 2) sur la fig. b.  
Ces cellules contiennent peu de granulations (fig. a) qui sont le plus  
souvent de même dimension que les granulations décrites dans le type II.

Dans la cellule 2, on remarque bien que le marquage est lié à  
la présence de granulations.

G: x7000





5115  
L111E

taille dont le noyau contenait un nucléole bien visible mais dont le cytoplasme ne renfermait pratiquement pas de granulations. Notons également que le diamètre de ces dernières est également plus proche de celui des granulations des cellules de type II.

La comparaison des coupes semi-fines et des coupes ultrafines, aussi bien sur les adénohypophyses de Cobayes en dioestrus qu'en période de lactation, indique que le marquage est lié à la présence de granulations. Les zones où l'ergastoplasme est développé sont toujours claires sur les coupes semi-fines.

#### b/ Technique immunocytochimique sur coupes ultrafines

Un excellent marquage est observable avec les anticorps anti-prolactines ovines et de Rat lorsqu'ils sont dilués au 1/500<sup>e</sup>.

Les réactions positives sont visibles sur toutes les granulations de cellules situées le plus souvent en bordure des capillaires. Ces granulations mesurent environ 3.000 Å de diamètre, mais dans quelques cellules, elles ont une taille inférieure (Pl. XXVI). Elles sont généralement arrondies mais parfois de forme irrégulière. Il apparaît ainsi de façon évidente que les seules cellules marquées sont bien les mêmes que celles individualisées par la méthode précédente.

Aucune réaction positive significative n'a été décelée dans le cytoplasme ainsi que dans les saccules de l'ergastoplasme et de l'appareil de Golgi.

#### c/ Technique immunocytochimique sur coupes au cryostat

Comme pour les types cellulaires précédents, nous avons comparé en microscopie photonique le marquage obtenu sur

Planche XXVI

Cellules marquées par l'anti prolactine ovine  
(technique au P.A.P.; Cobaye)

fig. a; Les cellules à prolactine de type I et II sont marquées (P)

G: x6500

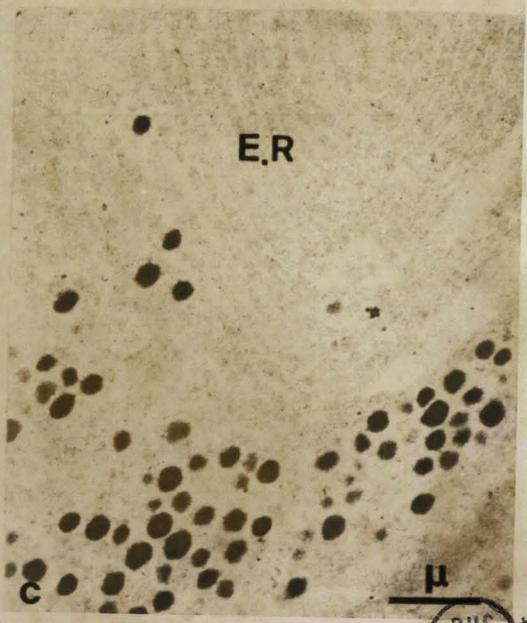
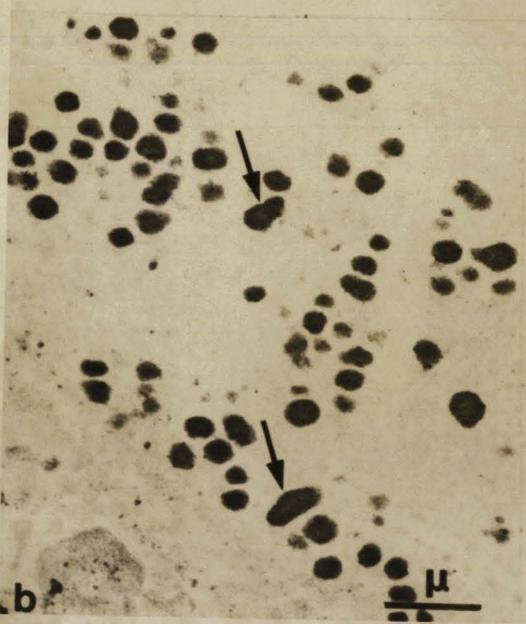
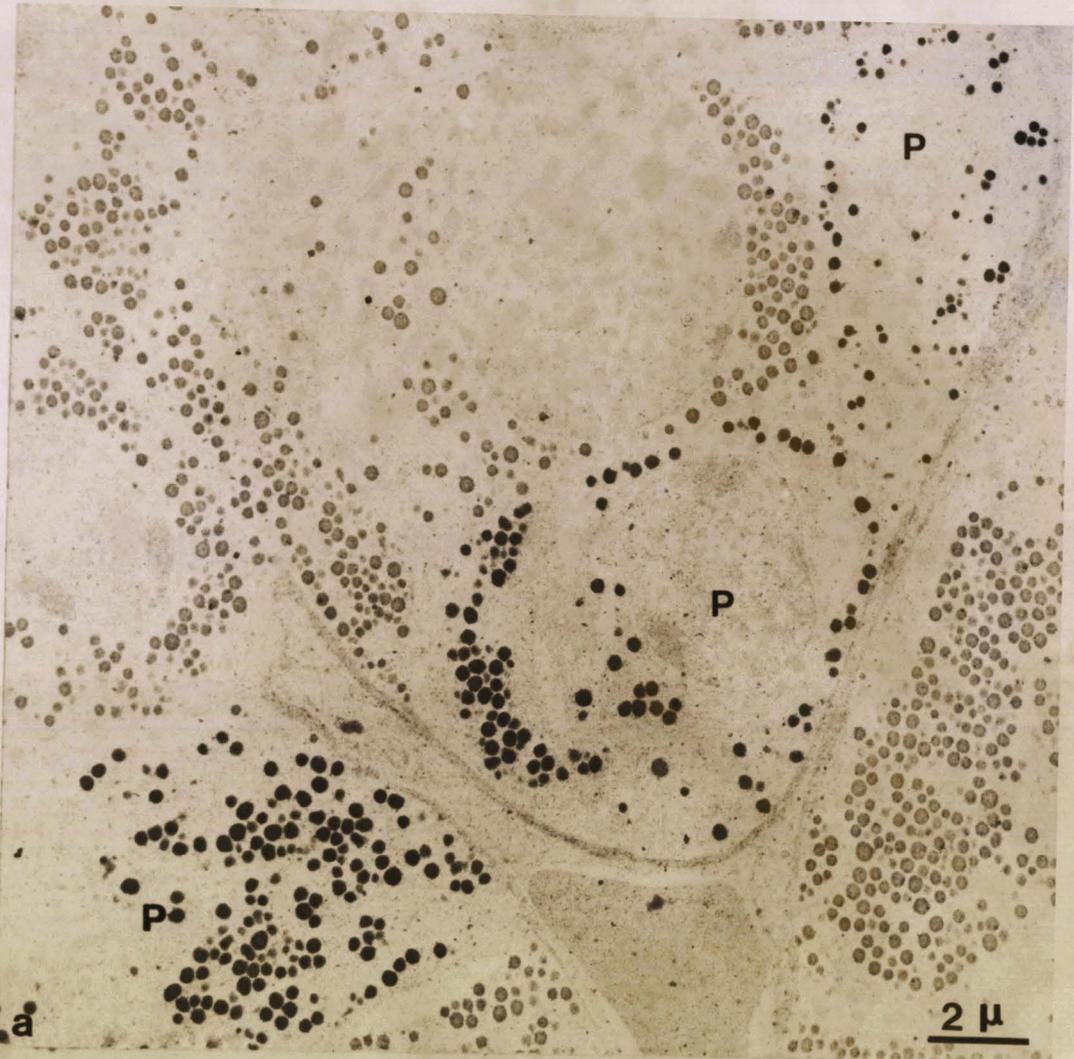
fig. b; On peut remarquer que toutes les granulations présentent des réactions positives, y compris celles de forme irrégulière (flèches).

G: x12500

fig. c; Dans les saccules ergastoplasmiques (ER) aucun marquage significatif n'est décelable.

G: x12000





BUS  
LILLE

les coupes à congélation avec celui obtenu sur les coupes semi-fines. On constate alors que les cellules marquées ont la même répartition dans les deux cas.

A l'échelle ultrastructurale les cellules immunoréactives sont malheureusement assez mal conservées (Pl. XXVII). De nombreuses altérations semblent dues à la congélation. Ceci paraît lié au type cellulaire car les cellules non marquées sont nettement moins endommagées.

Si des granulations ont une réaction positive, tout le cytoplasme présente également un marquage diffus. De plus, comme pour les autres types cellulaires, les membranes de l'ergastoplasme sont très contrastées.

Le noyau, les mitochondries ainsi que le contenu des saccules golgiens et ergastoplasmiques ne présentent par contre aucune réaction positive.

## 2 - Discussion

Les résultats que nous avons obtenus chez le Cobaye confirment les observations effectuées dans d'autres espèces, le Rat (Baker et coll, 1969), le boeuf (Nayak et coll, 1968; Dubois M.P., 1968), et plus récemment chez l'Homme (Halmi et coll, 1975; Martin-Comin et Robin, 1976) et chez le Singe (Girod et Dubois M.P., 1976a, b): il existe en effet un type de cellules uniquement marqué par l'anti-prolactine.

La mise en évidence de la prolactine de Cobaye par une réaction croisée avec de l'anti-prolactine ovine mais aussi avec de l'anti-prolactine de Rat, a pu être effectuée après double fixation P.A.F.-Tétroxyde d'osmium.

L'intérêt de la fixation au P.A.F. pour identifier ce type d'antigène en immunocytoenzymologie a été signalé par Nakane (1970) ainsi que par Parsons et Erlandsen (1974) pour l'observation des cellules à prolactine du Rat. Par contre, Bugnon et coll (1974a) ont pu obtenir des résultats satisfaisants

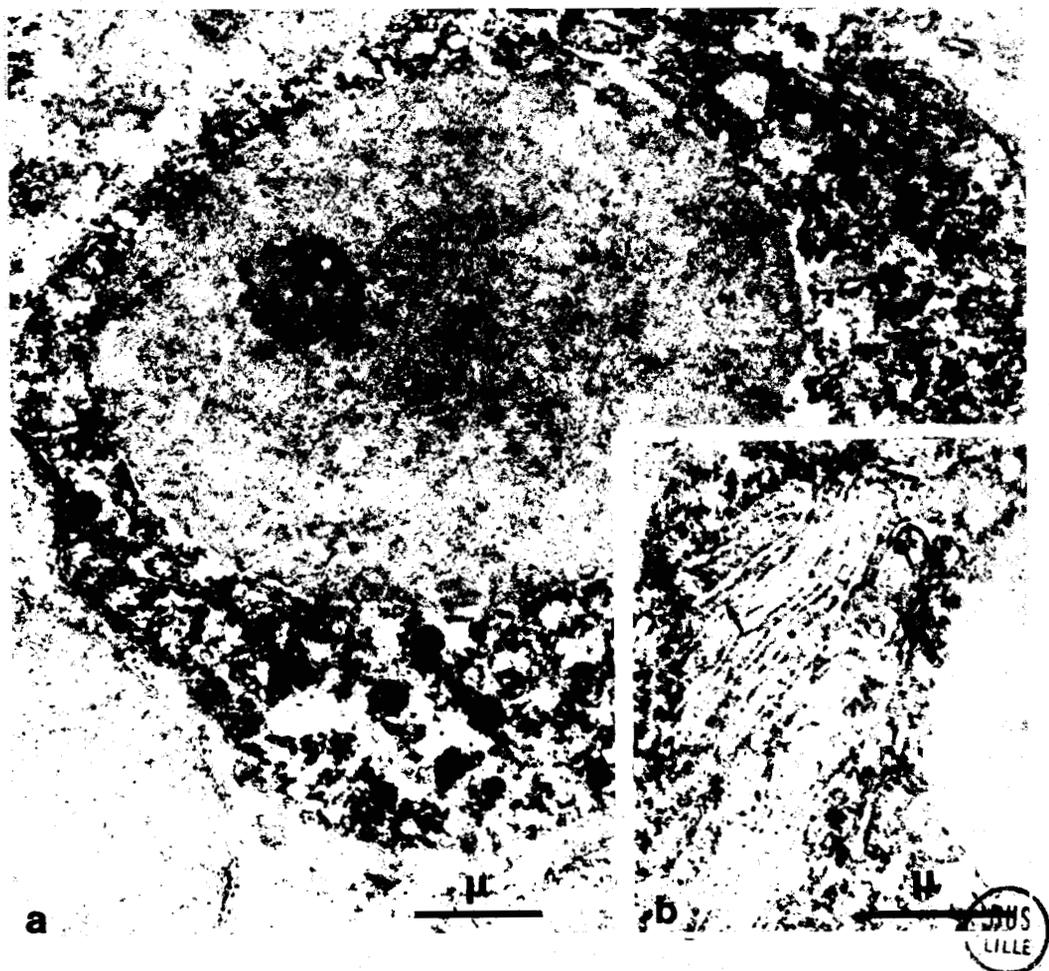


Planche XXVII

Cellule marquée par l'anti prolactine ovine  
(technique à congélation)

La conservation est mauvaise. On peut cependant constater qu'il existe un marquage sur les granulations mais aussi dans tout le cytoplasme (fig. a).

Les membranes ergastoplasmiques apparaissent très contrastées alors que le contenu des saccules (fig. b) ne présente pas de réactions positives (petites flèches).

fig. a: G: x17500

fig. b: G: x21000

chez le Renard après des fixations au glutaraldéhyde.

Comme pour les autres types cellulaires, le tétroxyde d'osmium n'altère donc pas l'immunoréactivité de la prolactine.

Alors que chez le Rat l'identification des cellules à prolactine n'a jamais posé de gros problèmes et que les techniques immunocytochimiques n'ont fait que confirmer ce qui était admis, il n'en est pas de même chez le Cobaye où ces cellules n'ont pu être individualisées par les techniques classiques. La technique des superpositions nous a donc permis de les identifier de façon certaine.

Nous avons alors constaté que la difficulté de les différencier des autres types cellulaires était due:

- à leur ressemblance avec un autre type cellulaire (les cellules somatotropes, ultérieurement étudiées).
- au fait qu'elles présentent des aspects variables.

En observant une grande quantité de cellules positives, nous avons dégagé un certain nombre de critères permettant de distinguer les cellules à prolactine des autres types cellulaires:

- elles présentent fréquemment des prolongements cytoplasmiques (moins importants que ceux des cellules corticotropes)
- les granulations, rarement nombreuses, sont dispersées dans tout le cytoplasme
- ces dernières présentent un espace clair entre le grain central et la membrane qui l'entoure
- il existe parfois quelques granulations de forme irrégulière.

Existe-t-il des points communs entre les cellules à prolactine du Cobaye et celles d'autres espèces?

along  
them  
from  
the  
the

La comparaison (Tabl. IX) entre les cellules à prolactine de quelques espèces, individualisées soit par des méthodes immunocytochimiques, soit par des méthodes indirectes, montre que l'ergastoplasme est presque toujours de type lamellaire. Par contre, les granulations apparaissent variables à la fois en taille et en forme. Ces variations d'aspect d'une espèce à l'autre font qu'il est parfois difficile de différencier les cellules à prolactine des cellules somatotropes lorsque nous n'avons pas recours aux techniques immunocytochimiques.

Dacheux et Dubois M.P. (1976) ont d'ailleurs prouvé que chez les bovins les cellules à prolactine décrites par Mikami (1970) étaient en fait des cellules somatotropes.

Les deux aspects I et II que nous avons pu observer chez le Cobaye correspondent vraisemblablement à des états de fonctionnement différents.

Le fait qu'en période de lactation on trouve surtout l'aspect n° II semble indiquer que ce dernier correspond à une période d'activité plus importante. Ces images de cellules peu granulées évoquent par ailleurs celles observées sur des adénomes hypophysaires à prolactine où les cellules renferment dans la majorité des cas peu de granulations (Racadot et coll, 1975) alors que le taux sérique de prolactine est très élevé.

Chez le Rat, de nombreux travaux (Revue dans Girod, 1976) ont montré également que les cellules à prolactine pouvaient contenir des quantités de granulations très variables. Ceci a pu aussi être vérifié sur des cellules à prolactine en culture (Snyder et coll, 1976).

	Forme de la Cellule	Noyau	Granulations	Ergastoplasme	Golgi
COBAYE (immuno)	- taille et forme variables près des cap.	rond	type I $2500 < \phi < 3500 \text{ \AA}$ type II $1800 < \phi < 2500 \text{ \AA}$ rondes (parfois irrégul.)	bien développé lamellaire	petite taille
RAT (ind. immuno)	- ovale	rond	$\phi \simeq 7000 \text{ \AA}$ forme irrégulière	bien développé lamellaire	plus ou moins développé
HAMSTER (ind)	- allongée près des cap.		$4000 < \phi < 8000 \text{ \AA}$ forme irrégulière	lamellaire et bien développé	bien développé
BOVINS (ind)	- ronde ou ovale		$6000 < \phi < 9000 \text{ \AA}$ denses rondes ou ovales	lamellaire bien développé	bien développé
BOVINS (immuno)	forme très varia- ble	noyau excentré	$3500 < \phi < 5000 \text{ \AA}$ forme ronde	lamellaire	moyen
RENARD (immuno)	forme variable		$2000 < \phi < 3000 \text{ \AA}$ forme ronde	lamellaire abondant	important
HOMME (ind)		rond	forme très irrégulière $6000 < \phi < 9000 \text{ \AA}$	lamellaire	taille variable

TABLEAU N° IX

COMPARAISON DE QUELQUES CARACTÉRISTIQUES ULTRASTRUCTURALES DÉCRITES DANS LES CELLULES À PROLACTINE DE MAMMIFÈRES, INDIVIDUALISÉES SOIT PAR DES TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES (IMMUNO) OU INDIRECTES (IND).



### Apport des techniques immunocytochimiques

Nous avons obtenu avec la technique immunocytochimique sur coupes ultrafines avec la P.A.P., des résultats superposables à ceux de Parsons et Erlandsen (1974) et de Dacheux et Dubois M.P. (1976). En effet, dans les trois cas, seules les granulations ont présenté des réactions positives.

Ce résultat concorde très bien avec ceux obtenus sur coupes semi-fines où les réactions positives sont à l'échelle photonique exclusivement localisées là où se trouvent les granulations.

Avec la technique au cryostat, nos résultats sont absolument semblables à ceux observés pour les autres types cellulaires. Le marquage est présent:

- sur les granulations
- dans le cytoplasme
- sur les membranes de l'ergastoplasme.

Là encore, ces observations concordent avec celles de Nakane (1970) ainsi qu'avec celles de Tixier-Vidal sur les cellules à prolactine en culture (1976).

Un certain nombre de chercheurs sont en faveur de l'existence d'un pool extragranulaire d'hormone et notamment Grosvenor et coll (1967). Leurs arguments sont les suivants:

- il existe un taux hypophysaire de prolactine important alors que le nombre de granulations des cellules correspondantes est faible.

- lors de succions (Grosvenor et Mena, 1971), il existe un pool de prolactine rapidement excrété, puis un pool plus tardif. Le premier pourrait alors correspondre à une forme soluble située dans les vacuoles ergastoplasmiques alors que le deuxième serait la forme de prolactine située dans les granulations. Chang et Nikotovich Winer (1976) observent chez le Rat en microscopie électronique des images qui pourraient d'ailleurs étayer cette théorie.

Il est à noter cependant que pour ces auteurs le pool extragranulaire se trouverait donc être dans les vésicules ergastoplasmiques alors que pour notre part, nous n'avons jamais vu de marquage à ce niveau.

Par contre, les travaux déjà mentionnés de Maurer et coll (1976), Evans et Rosenfeld (1976), Dannies et Tashjian (1976) pourraient expliquer l'existence d'un marquage sur les membranes de l'ergastoplasme. La prolactine a un poids moléculaire de 22.500 et est constituée de 193 acides aminés. Or, ces auteurs ont montré qu'à partir d'ARN messenger provenant de cellules à prolactine, était synthétisée une molécule de poids moléculaire 28.000 qui contient toute la séquence d'acides aminés de la prolactine plus 29 acides aminés accolés à la partie N terminale de la prolactine (Maurer et coll, 1977). Cette molécule a les mêmes déterminants antigéniques que la prolactine.

Par ailleurs, l'analyse de ce segment supplémentaire fait penser qu'il est hydrophobe et qu'il jouerait un rôle dans la liaison entre la protéine nouvellement synthétisée et les membranes de l'ergastoplasme (Maurer et coll, 1977). Ce segment serait ensuite enlevé au niveau des citernes ergastoplasmiques. Cette pré-prolactine immunoréactive dans les techniques d'immunoprécipitation pourrait peut-être expliquer l'existence du marquage au niveau des membranes de l'ergastoplasme. Par contre, elle ne permet pas de comprendre le marquage dans le cytoplasme.

Le problème de la différence des résultats observés avec les deux techniques (P.A.P. et cryostat) reste le même que pour les autres types cellulaires:

- ou le marquage observé au cryostat est un artefact
- ou l'inclusion et la technique au P.A.P. ne permet pas de mettre en évidence la prolactine extragranulaire.

Parsons et Erlandsen (1974) avaient expliqué l'absence de marquage dans l'ergastoplasme avec la technique au P.A.P. en disant que "la prolactine pourrait ne pas être reconnaissable par les anticorps avant d'être empaquetée et d'avoir acquis une structure tertiaire". Les travaux de Maurer et coll (1977) indiquent au contraire que la pré-prolactine est déjà reconnu par les anticorps.

### CONCLUSION

Grâce aux techniques immunocytochimiques, nous avons pu mettre en évidence les cellules à prolactine de l'adénohypophyse du Cobaye, et ainsi dégager quelques critères permettant de les différencier essentiellement des cellules somatotropes.

Ces cellules présentent des aspects variables selon leur état de fonctionnement. Par ailleurs, elles sont très différentes des cellules à prolactine classiquement décrites dans l'adénohypophyse de Rat.

La caractérisation des cellules à prolactine par simple analogie à celle de cette espèce paraît donc hasardeuse.

En ce qui concerne la localisation des sites antigéniques, nos observations du marquage des membranes de l'ergastoplasme sont compatibles avec les récents travaux de Maurer et coll (1977).

Ceci indiquerait que l'inclusion aussi bien pour la technique de superpositions que pour celle au P.A.P., ne serait pas favorable à la mise en évidence d'un marquage extragranulaire.



LES CELLULES SOMATOTROPES

A/ Etat des connaissances concernant la structure fine de ce type cellulaire au début de nos travaux

De nombreux chercheurs ont constaté très tôt en observant des hypophyses de Souris naines ou des hypophyses humaines pathologiques (acromégalie) en microscopie photonique que la sécrétion d'hormone somatotrope était liée à un type de cellule acidophile et plus précisément aux cellules ayant une forte affinité pour l'orangé G ainsi que pour le bleu Luxol (Herlant, 1950; Shanklin et coll, 1959; Racadot, 1962). On a remarqué alors que la thyroïdectomie était suivie d'une régression et parfois même d'une disparition des cellules acidophiles. Ce type d'expérimentation a de ce fait été énormément utilisé pour la mise en évidence des cellules à STH (Revue dans Girod, 1976).

En microscopie électronique les premières descriptions ont été fournies encore une fois par Farquhar et Rinehart (1954a,b) à partir d'adénohypophyses de Rats castrés ou thyroïdectomisés. Ces résultats seront confirmés par Lever et Peterson (1960).

Parallèlement, Barnes (1961, 1962) individualise ce même type cellulaire chez la Souris en comparant des hypophyses de jeunes animaux en pleine croissance à celles d'individus âgés. D'autres observations seront aussi effectuées chez le Lapin (Salazar, 1963) et le Hamster (Dekker, 1968).

Toutes les cellules somatotropes présentent les mêmes caractéristiques en microscopie électronique: ce sont des cellules rondes ou ovales, renfermant une grande quantité de granulations de taille importante (3 000 à 4 000 Å de diamètre). L'ergastoplasme est constitué de saccules à disposition parallèle et se trouve

généralement situé à un pôle de la cellule. L'appareil de Golgi est localisé près du noyau et a un aspect variable selon l'état d'activité de la cellule. Les lysosomes semblent relativement nombreux surtout chez les sujets âgés. Le noyau est souvent rond et volumineux.

B/Etat des travaux de nature immunohistochimique  
en microscopie photonique

Les premiers travaux ont été effectués en immunofluorescence sur l'adénohypophyse de l'Homme (Leznoff et coll, 1960) en utilisant de l'antiSTH humaine. Les cellules marquées sont des cellules acidophiles mais aucune précision supplémentaire ne peut être donnée.

Grumbach (1962) obtient sur l'hypophyse du Rat des réactions positives uniquement sur un type cellulaire acidophile, correspondant aux cellules orangéophiles du tétrachrome de Herlant.

Des recherches analogues seront entreprises sur un très grand nombre d'espèces en utilisant des anticorps anti STH d'origine humaine, bovine, ovine et de Rat (Revue dans Girod, 1976).

Notons que les observations les plus récentes ont surtout été pratiquées sur les adénohypophyses de Primates (Halmi et coll, 1975, Girod et DUBOIS M.P., 1976a, b). Dans le travail d'Halmi et coll (1975) il est intéressant de remarquer que pour la première fois les cellules à STH humaines ont été mises en évidence grâce à des anticorps fabriqués à partir de STH de Rat. Il était en effet admis jusqu'alors que seuls les anticorps anti STH humaine permettaient d'obtenir ces réactions.

En fait, si l'obtention de réactions croisées pose parfois des problèmes, Hayashida et coll (1975) ont montré par contre qu'il existait une très grande analogie de structure entre les STH d'espèces différentes. Ils démontrent l'existence de réactions croisées entre un anti STH de tortue avec de la STH

non seulement de reptiles et d'oiseaux mais aussi de mammifères. Seules les STH de primates ne réagissent pas avec les anticorps anti STH de tortue.

La caractérisation des cellules somatotropes a souvent été menée parallèlement à l'étude des cellules à prolactine et certains auteurs ont alors employé la méthode du double marquage préconisée par Nakane (1968). Le marqueur est la péroxydase mais il peut être révélé soit par la diamino-benzidine (coloration brunâtre), soit par le naphtol (coloration bleue). De bons résultats ont ainsi été obtenus par Martin-Comin et Robyn (1976).

A l'exception de quelques cas où la différenciation entre cellules à prolactine et cellules somatotropes a été plus délicate, les techniques immunocytochimiques n'ont pratiquement rien apporté de nouveau concernant la connaissance des cellules somatotropes en microscopie photonique. Ceci est également valable pour l'étude des hypophyses pathologiques (acromégalie) où l'immunocytochimie n'a souvent été utilisée que comme élément de confirmation du diagnostic effectué la plupart du temps grâce à une coloration au tétrachrome de Herlant.

#### C/ Résultats obtenus par l'application des techniques immunocytochimiques à la microscopie électronique

Avec la même méthode que celle employée pour la mise en évidence des cellules à prolactine, Nakane (1970) a décrit les cellules somatotropes du Rat. Ces travaux confirment les observations de Farquhar et Rinehart (1954a,b). Les cellules somatotropes du Rat sont donc des cellules arrondies contenant des granulations de 3 000 à 3 500 Å de diamètre réparties dans tout le cytoplasme. L'ergastoplasme se présente sous forme de saccules parallèles. Nakane ne mentionne pas l'existence d'un marquage extragranulaire.

Erlandsen et coll (1975) décrivent ce même type cellulaire chez le Rat avec la technique au P.A.P. Les conclusions sont semblables à celles de Nakane.

Une autre étude a été effectuée sur l'adénohypophyse des bovins par Dacheux et Dubois M.P. (1976): les cellules à STH individualisées (technique au P.A.P.) contiennent de nombreuses granulations de 5 000 à 9 000 Å de diamètre et l'ergastoplasme est de type lamellaire. Ce type cellulaire correspond en fait aux cellules que Mikami (1970) avait décrites comme cellules à prolactine chez les bovins.

Un travail a également été réalisé avec cette même technique par Li et coll (1977) sur l'hypophyse humaine foetale. Les résultats démontrent l'apparition précoce de cellules possédant des granulations d'environ 3 000 Å, réagissant avec l'anti STH humaine. Notons également que dans ce dernier travail, la fixation a été exclusivement effectuée à l'aide de tétroxyde d'osmium.

#### D/Données récentes sur le mode d'élaboration de la STH

De nombreux auteurs (Frohman et coll, 1972; Goodmann et coll, 1972; Yoshimura et coll, 1974; Guyda, 1975) ont mis en évidence aussi bien au niveau sérique qu'hypophysaire plusieurs hormones somatotropes, différentes par leurs poids moléculaires. Dénommées "big-big GH", "big GH" et "little GH", Yoshimura et coll ont montré qu'elles étaient toutes trois immunoréactives. Par ailleurs, la "big-big GH" semble pouvoir se transformer en "big GH" et "little GH" alors que l'inverse est impossible. Ces auteurs pensent donc que la "big-big GH" pourrait être soit un polymère de la "little GH", soit un précurseur (prohormone).

Cependant, plus récemment, d'autres travaux (Sussman et coll, 1976; Lingappa et coll, 1977) ont été menés dans la même optique que ceux effectués sur la synthèse de la prolactine. Il

a été ainsi montré qu'à partir d'ARN messager provenant de cellules somatotropes était synthétisée une molécule dont le poids moléculaire est très légèrement supérieur à celui de la véritable STH. Il y aurait en fait 26 ou 27 acides aminés supplémentaires dans cette préhormone. Cette séquence pourrait correspondre, dans l'hypothèse de Blobel et Dobberstein (1975) à un peptide permettant à la fois la liaison ribosome-membrane du reticulum endoplasmique puis le passage de la protéine entière à travers la membrane.

Les cellules somatotropes du Cobaye comme les autres types cellulaires n'ont jamais été étudiées en microscopie électronique. Ce travail a donc été réalisé et a fait l'objet d'une publication (Beauvillain et coll, 1977).

## E/ Recherches personnelles

Les adénohypophyses de Cobayes mâles ont été étudiées par les trois techniques déjà décrites.

Les anticorps utilisés ont été de l'anti STH humaine (Kabi Stockholm). Ils ont été dilués au 1/80<sup>e</sup> pour les techniques de superpositions et de congélation, et au 1/250<sup>e</sup>, au 1/500<sup>e</sup>, au 1/1000<sup>e</sup> pour la technique employant le P.A.P.

### 1 - Résultats

#### a/ Technique de superpositions

##### *- Coupes semi-fines*

Le marquage est obtenu aussi bien après des doubles fixations glutaraldéhyde-paraformaldéhyde et tétroxyde d'osmium que P.A.F. suivi de tétroxyde d'osmium. Ces cellules sont très nombreuses et sont régulièrement réparties dans toute l'hypophyse avec cependant une plus grande concentration dans les lobes latéraux.

Ces résultats sont semblables à ceux observés sur des coupes à la paraffine après fixation au Bouin Hollande Herlant. Les cellules ont une forme ovoïde et sont souvent groupées.

##### *- Coupes ultrafines*

Toutes les cellules marquées sur les coupes semi-fines et retrouvées sur les coupes ultrafines sont semblables. Elles sont caractérisées par un cytoplasme clair et un noyau rond contenant un nucléole de grande taille. Les granulations ont une forme régulière et mesurent entre 2 500 et 3 500 Å de diamètre. (Pl. XXVIII).

Planche XXVIII

Superposition d'observations de coupes semi-fine et ultrafine  
(Cobaye)

fig. a; Quelques cellules sont mises en évidence par l'anti  
STH humaine (S)

fig. b; Ces mêmes cellules sont observées à l'échelle  
ultrastructurale (S).

G: x17500





HIS  
LITTLE

Le grain central est dense aux électrons et apparaît homogène. On n'observe généralement pas d'espace clair entre celui-ci et la membrane qui l'entoure. (Pl. XXIX).

Dans la plupart des cellules, les granulations sont nombreuses et remplissent pratiquement tout le cytoplasme. Dans ce cas, l'ergastoplasme ainsi que l'appareil de Golgi apparaissent peu développés.

Quand les granulations sont moins nombreuses, l'ergastoplasme est nettement plus visible. Il est alors de type lamellaire. L'appareil de Golgi par contre, reste toujours de petite taille.

Les mitochondries ont une matrice peu dense aux électrons. Quelques lysosomes sont parfois présents mais ils ne sont pas très caractéristiques de ce type cellulaire.

La comparaison entre les coupes semi-fines et ultra-fines permet de constater que les régions de l'appareil de Golgi et de l'ergastoplasme ne présentent pas de réactions positives sur les coupes semi-fines.

b/ Technique immunocytochimique  
sur coupes ultrafines

Les meilleurs résultats ont été obtenus après des dilutions au 1/500<sup>e</sup> et au 1/1000<sup>e</sup> de l'anticorps. Un grand nombre de cellules, toutes semblables, sont marquées.

Seules les granulations présentent des réactions positives. Les précipités que l'on peut parfois observer dans le cytoplasme ne semblent pas significatifs car ils existent également dans les cellules voisines non immunoréactives. Il apparaît par ailleurs qu'aucun marquage ne peut être détecté au niveau de l'ergastoplasme et de l'appareil de Golgi. (Pl. XXXb).

Planche XXIX

Aspect de la cellule somatotrope le plus souvent observé

La cellule est de forme ovale. Le noyau rond contient un nucléole important. Les granulations sont rondes et on ne voit pas d'espace clair entre le grain et la membrane (flèches).

L'ergastoplasme est de type lamellaire (ER).

G: x14000





μ  
B.S.  
LILLE

c/ Technique immunocytochimique  
sur coupes au cryostat

En microscopie photonique, une grande quantité de cellules apparaissent marquées sur les coupes à congélation.

A l'échelle ultrastructurale, la conservation des cellules est généralement satisfaisante. Toutes les granulations présentent une réaction positive alors que le noyau et les mitochondries sont toujours négatifs (Pl. XXXI).

Un léger marquage est aussi observé dans le cytoplasme et surtout le long des membranes ergastoplasmiques. Dans certains cas, les ribosomes apparaissent nettement plus contrastés que les ribosomes des cellules voisines. Comme dans les autres types cellulaires, aucune réaction positive n'a pu être observée dans les saccules de l'ergastoplasme et de l'appareil de Golgi.

2 - Discussion

Des résultats positifs ont été obtenus avec différents types de fixations. Ceci concorde avec l'ensemble des travaux publiés sur ce sujet. En effet, Nakane (1971), Dacheux et Dubois M.P. (1976) ont utilisé une double fixation P.A.F.-tétroxyde d'osmium, Erlandsen et coll (1975) une simple fixation au glutaraldéhyde, alors que Li et coll (1977) emploient le tétroxyde d'osmium.

Les cellules somatotropes que nous avons individualisées chez le Cobaye répondent parfaitement aux critères de la cellule somatotrope type. Elle est notamment semblable à celle décrite chez le Rat (Farquhar et Rinehart, 1954), la Souris (Barnes, 1961), le Lapin (Salazar, 1963), l'Homme (Von Lawzewitsch et coll, 1972). Seules les cellules à STH des bovins possèdent des granulations de taille plus importante (Dacheux et Dubois M.P., 1976).

Le seul problème délicat en ce qui concerne le Cobaye est de bien différencier ces cellules à STH de celles qui

Planche XXX

Cellules marquées par l'anti STH humaine  
(technique au P.A.P.; Cobaye)

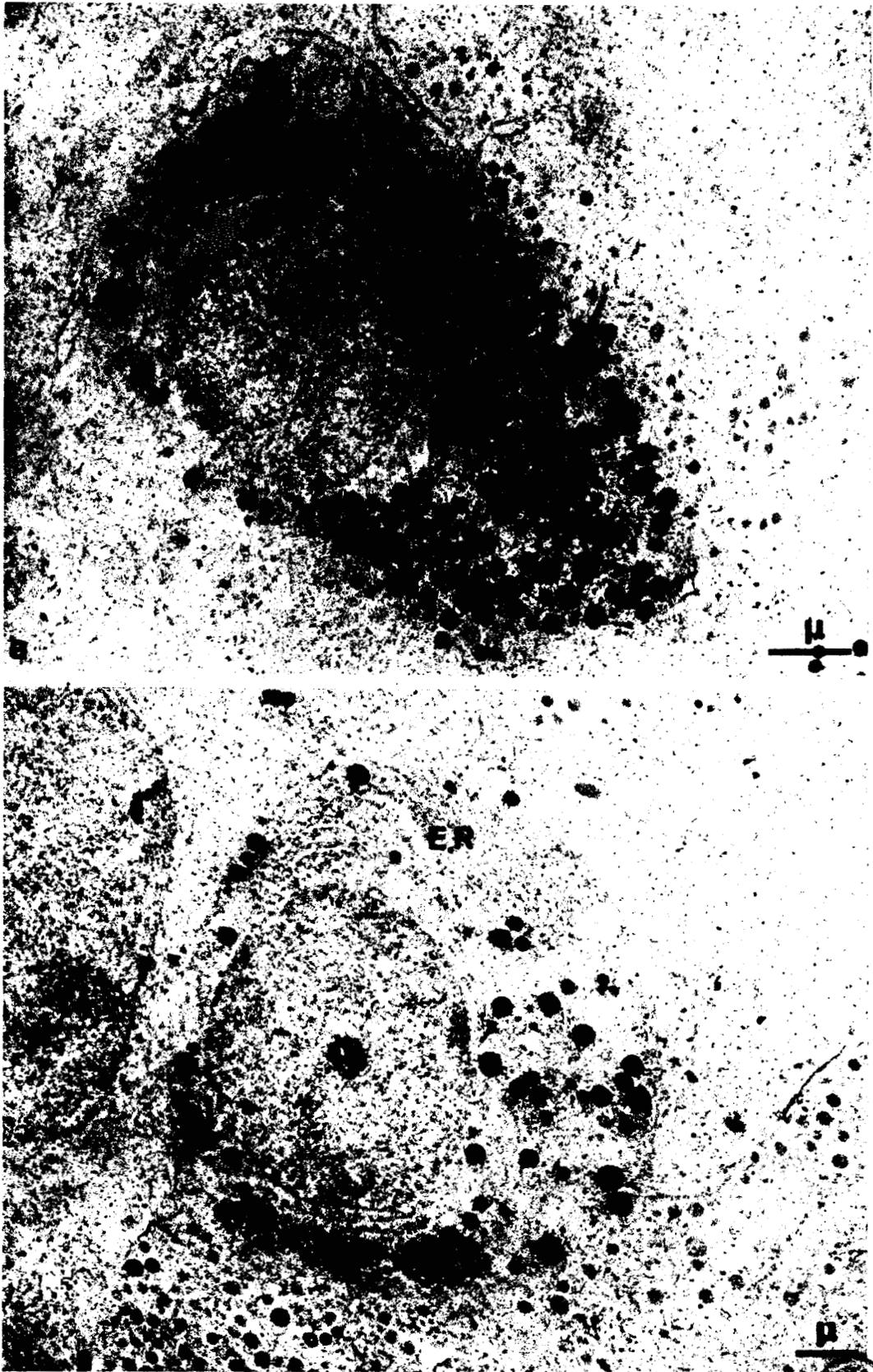
fig. a; Cellule contenant de très nombreuses granulations toutes marquées, occupant pratiquement l'ensemble du cytoplasme.

G: x13000

fig. b; Dans certaines cellules il existe par contre peu de granulations. L'ergastoplasme qui est alors bien visible ne présente pas de réaction positive.

G: x9500





ATIS  
LILKE

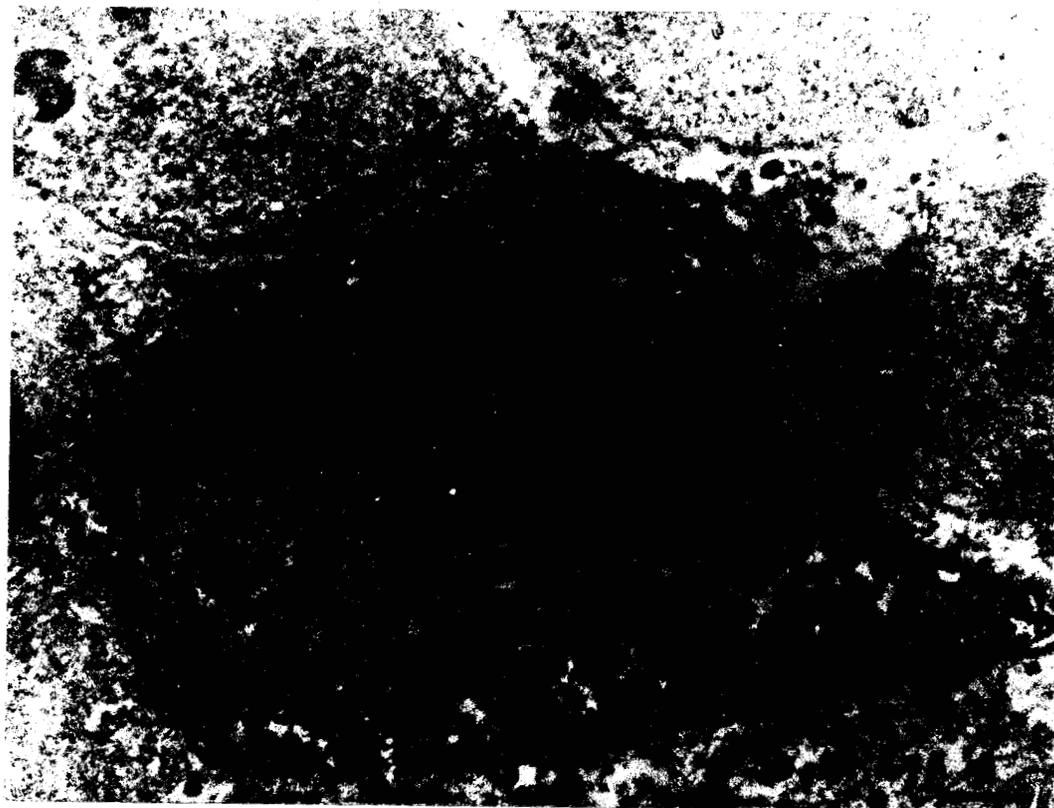


Planche XXXI

Cellule marquée par l'anti STH humaine  
(technique à congélation; Cobaye)

Toutes les granulations sont marquées (grandes flèches)  
mais on peut remarquer qu'il existe une réaction (petites  
flèches) sur les membranes de l'ergastoplasme.

G: x12500

	Forme de la cellule	Noyau	Granulations	Ergastoplasme	Golgi
COBAYE (immuno)	- ronde ou ovale	rond	$2500 < \phi < 3500 \text{ \AA}$ denses rondes	aspect lamellaire plus ou moins développé	peu développé
RAT (ind. immuno)	- ovale	rond central	$3000 < \phi < 3500 \text{ \AA}$	aspect lamellaire plus ou moins développé	plus ou moins développé
HAMSTER (ind)	- ronde ou ovale	rond	$\phi \approx 3000 \text{ \AA}$ denses rondes	aspect lamellaire plus ou moins développé	peu développé
BOVINS (ind)	- ronde ou ovale		$\phi \approx 4500 \text{ \AA}$ denses rondes	aspect lamellaire	peu développé
BOVINS (immuno)	- ronde ou ovale	rond	$5000 < \phi < 9000 \text{ \AA}$ rondes	aspect lamellaire	bien développé
RENARD (superpos. coloration)	- ronde ou ovale	rond	$4000 < \phi < 5000 \text{ \AA}$ rondes	aspect lamellaire	
HOMME (ind)	- ronde ou ovale	rond	$3500 < \phi < 4000 \text{ \AA}$	aspect lamillaire	peu développé

TABLEAU N° X

COMPARAISON DE QUELQUES CARACTERISTIQUES ULTRASTRUCTURALES DÉCRITES DANS LES CELLULES SOMATOTROPES DE QUELQUES MAMMIFÈRES INDIVIDUALISÉES SOIT PAR DES TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES (IMMUNO) OU INDIRECTES (IND).



synthétisent la prolactine (nous avons vu précédemment qu'il existait de nombreux caractères communs dans certains cas).

Cependant, les cellules à STH sont plus ovoïdes que les cellules à prolactine et les granulations sont souvent plus nombreuses et groupées à un pôle. Par ailleurs, les granulations sont bien rondes et il n'existe pas d'espace entre le grain central et la membrane qui l'entoure alors que celui-ci est bien visible dans les cellules à prolactine.

#### Apport des techniques immunocytochimiques utilisant le P.A.P. et la congélation

Comme dans les cellules thyroïdiques, gonadotropes et à prolactine, les granulations sont positives dans les deux techniques alors que le cytoplasme et les membranes de l'ergastoplasme ne le sont qu'après la technique à congélation. Dans ce dernier cas, les ribosomes apparaissent assez nettement marqués sur certaines images.

Les travaux de Lingappa et coll (1977) ont montré que l'ARN messager de cellules tumorales sécrétant de la STH synthétise une préhormone déjà immunoréactive. Or, selon ces auteurs, cette molécule serait localisée au niveau du complexe ribosome-membrane du réticulum endoplasmique (le rôle de la partie peptidique supplémentaire serait justement de permettre la formation de ce complexe ainsi que le passage de la protéine dans la cavité ergastoplasmique).

On peut donc penser que le marquage que l'on observe sur les membranes et peut-être sur les ribosomes correspond à cette préhormone.

L'absence de réaction positive dans les cavités ergastoplasmiques puis golgiennes pourrait s'expliquer alors de plusieurs façons:

- les antigènes à ce niveau ne peuvent être fixés

et disparaissent pendant la fixation

- les antigènes à ce niveau sont dénaturés par le fixateur; il est possible que l'effet de celui-ci soit différent selon l'endroit où se situe l'antigène.

Concernant le marquage cytoplasmique et l'existence par conséquent d'un pool extragranulaire d'hormone, nous ne connaissons actuellement aucun argument autre que le marquage que nous avons vu mais que Tixier-Vidal et coll (1976) ont également observé sur les cellules à STH en culture.

#### CONCLUSION

Les cellules somatotropes du Cobaye possèdent les caractéristiques ultrastructurales classiquement décrites pour ce type cellulaire.

Il apparaît ainsi que ces cellules varient peu d'une espèce à une autre et qu'il est ainsi possible de les individualiser assez facilement par simple analogie.

Comme pour les autres types cellulaires, l'existence d'un marquage extragranulaire doit être considéré avec prudence.

CONCLUSION GENERALE

Les premières observations à l'échelle ultrastructurale de l'adénohypophyse ont été effectuées chez le Rat. L'ablation d'organes cibles, l'injection de drogues ont permis d'attribuer à chaque aspect cellulaire une fonction sécrétrice précise.

Un certain nombre d'auteurs ont alors considéré l'adénohypophyse de Rat comme un modèle et ont retrouvé dans d'autres espèces des cellules ayant approximativement les mêmes aspects ultrastructuraux, auxquelles ils ont attribué la même fonction.

L'application des techniques immunocytoenzymologiques à la microscopie électronique n'a d'ailleurs pas changé cet état de fait car jusqu'en 1973, tous les travaux publiés ne concernaient encore une fois que l'adénohypophyse de Rat.

Le but essentiel de notre travail a été de caractériser directement les types cellulaires de l'adénohypophyse de Cobaye ainsi que les cellules gonadotropes et corticotropes du Lérot à l'échelle ultrastructurale, chez des animaux normaux à l'aide de méthodes immunocytochimiques.

Au moment où ont commencé nos travaux, nous avons constaté que les techniques immunocytochimiques employées par Nakane (1970), Moriarty et Halmi (1972) permettaient surtout d'étudier la localisation subcellulaire des hormones. Une description précise de la cellule était difficile à effectuer en raison:

- de l'existence de nombreuses altérations de la structure liées aux conditions de fixation, de fabrication de coupes épaisses (technique immunocytochimique avant inclusion), aux manipulations nombreuses.
- de l'absence de contraste des éléments qui ne sont pas immunoréactifs.

Il nous a donc semblé nécessaire de mettre au point une méthode permettant d'obtenir des réactions immunohistochimiques sur du matériel préparé de façon classique pour la microscopie électronique.

En obtenant ces réactions sur des coupes semi-fines, et en observant les coupes ultrafines adjacentes, nous avons l'avantage sur les autres auteurs de pouvoir retrouver sur une même coupe les cellules marquées (comparaison avec les coupes semi-fines voisines étudiées en microscopie photonique) ainsi que les autres catégories cellulaires.

Cette méthode s'est avérée d'autant plus intéressante que pour chaque type cellulaire nous avons pu obtenir des réactions positives après des doubles fixations (Tab. XI) ce qui permet par ailleurs de faire une corrélation avec les observations effectuées de façon classique chez d'autres espèces.

Chaque catégorie cellulaire a pu être décrite après un grand nombre de superpositions. Avec un même anticorps, les résultats obtenus ont toujours été identiques et à l'échelle ultrastructurale, les cellules marquées appartiennent à un même type dont les principales caractéristiques peuvent être résumées dans le tableau XII.

En comparant la structure fine des cellules adénohypophysaires du Cobaye et du Lérot avec celles d'autres mammifères on constate que:

- les cellules somatotropes sont pratiquement toutes semblables

- les cellules gonadotropes sont toujours situées près des capillaires; l'appareil de Golgi, les mitochondries et les granulations présentent le même aspect. Par contre, la taille de ces dernières peut varier.

Dans ces cas, la structure des cellules étant comparable il nous paraît donc possible d'individualiser ces deux catégories cellulaires chez de nombreuses espèces en employant les descriptions types.

Anticorps Anti	LEROT			COBAYE				
	GF/OSO <sub>4</sub>	PAF OSO <sub>4</sub>	GL	GF/OSO <sub>4</sub>	PAF OSO <sub>4</sub>	PAF	GF	GL
$\alpha$ 17-39 ACTH	-	-	-	+	++	++	+	+
$\beta$ 1-24 ACTH	++	++	+	+	+	+	+	+
$\beta$ MSH	++	++	+	-	-	-	-	-
LH ovine totale	+	+	+	++	++	++	++	+
PMSG	+	++	+	++	++	++	++	+
LH $\beta$ porcine	+	++	+	++	++	++	++	
FSH $\beta$ de rat	+	+	+	-	-	?	?	?
TSH bovine				-	+	+	-	-
Prolactine de rat				-	+	+	-	-
Prolactine ovine				-	+	+	-	-
STH humaine				+	+	+	+	+



TABLEAU XI. RECAPITULATION DES RESULTATS OBTENUS AVEC LES DIFFERENTS ANTICORPS  
SELON LE MODE DE FIXATION

COBAYE	Forme et localisation de la cellule	Noyau	Asp. cytoplasme	Granulations	Ergastoplasme	Golgi	Mitochondries	Particularités
CORTICOTROPE	- irrégulière - avec prolongements	rond de petite taille	clair	- peu nombreuses - $1800 < \phi < 2000 \text{Å}$ - grains denses	- peu développé - forme des petits empilements	moyen	- petite taille - matrice dense	existence de vésicules vides ou à contenu très peu dense aux électrons
GONADOTROPE	- le plus souvent allongée - près des capillaires	rond	foncé	- nombre variable $2000 < \phi < 2500 \text{Å}$ - grains hétérogènes - membranes bien visibles	- moyennement développé - sous forme de saccules pfs légèrement dilatés dispersés dans le cytoplasme	- grande taille - formé de plusieurs dictyosomes (→ circulaire)	- nombreuses - allongées - matrice dense (concentrées autour du Golgi)	
THYREOTROPE	- de grande taille - près des capillaires	- rond - nucléole bien visible	foncé	- nombreuses $1500 < \phi < 2000 \text{Å}$ - aspect variable - grains homogènes et hétérogènes	- moyennement développé - apparaît sous forme de saccules ou de vacuoles	- moyen formé de plusieurs dictyosomes	- petite taille - matrice dense	existence de vésicules vides ou ne renfermant qu'un petit élément dense aux électrons
PROLACTINE	- taille et forme variable - souvent située près des capillaires	- rond - taille moyenne	clair	Type I : ± nombreuses $2500 < \phi < 3500$ grain dense hom. Type II : peu nombreuses $1800 < \phi < 2500$ grain dense hom.	bien développé aspect lamellaire  moy. développé aspect lamellaire et vacuolisé	- petite taille - les saccules sont souvent dilatés	- taille moyenne - matrice claire	
SOMATOTROPE	- ronde ou ovale	- rond - nucléole bien visible	clair	nombreuses $2500 < \phi < 3500$ - denses (membr. non visible)	± développé selon les cellules - aspect lamellaire	petite taille	- taille moyenne - matrice claire	

LEROT

CORTICOTROPE	ronde ou ovale	rond	clair	- nombreuses $2500 < \phi < 3500 \text{Å}$ - denses - membrane bien visible	- moyen. développé sous forme de saccules sans arrangement particulier	moyen	- taille variable - matrice claire	
GONADOTROPE	- forme variable - situé près des capillaires	souvent encoché	foncé	$1800 < \phi < 2000$ - grain hétérogène - membrane visible	- importance variable - formé de saccules mais parfois très vacuolisé	- grande taille - formé de plusieurs dictyosomes (→ circulaire)	- taille moy. - matrice dense - plus nombreuses près du Golgi	



Par contre, pour les cellules corticotropes, thyroïdiques et à prolactine, on peut constater qu'il existe de nombreuses variations d'une espèce à l'autre. Ainsi, les cellules corticotropes du Lérot ne ressemblent en rien à celles du Cobaye et du Rat. Il est par ailleurs surprenant de voir qu'il existe beaucoup plus de points communs entre les cellules corticotropes de l'Homme et du Lérot qu'entre les cellules corticotropes d'animaux appartenant à un même Ordre (Rongeurs).

De même, il semblait admis que les cellules à prolactine étaient des cellules à très grosses granulations de forme irrégulière; en fait, on constate que ce n'est pas le cas chez le Cobaye.

En conclusion, il n'existe pas pour ces catégories cellulaires un type unique et leur caractérisation par simple analogie n'est pas possible.

Nous avons été également amenés à étudier le problème de l'unicité ou non d'un type cellulaire gonadotrope chez le Lérot et le Cobaye. Pour notre part, nous n'avons mis en évidence avec tous les anticorps antigonadotropines employés (y compris anti FSH<sub>h</sub> et LH<sub>h</sub> chez le Lérot) qu'un seul type de cellule. Nous avons montré que toutes les cellules marquées présentaient approximativement le même aspect en microscopie électronique. Ceci est donc en faveur de la théorie uniciste des cellules gonadotropes alors que certains résultats obtenus après injection de drogues (oestrogènes) semblent par contre indiquer qu'il existerait deux populations de cellules gonadotropes (Hassani et Roos, 1976).

Par ailleurs, en dehors de la méthode des superpositions, les autres techniques immunocytochimiques (avant ou après inclusion) ont été employées pour tenter de localiser avec plus de précision les sites antigéniques au sein même de la cellule. Malheureusement les résultats obtenus ont été peu concordants. C'est ainsi que:

- d'une part, avec la technique utilisant le cryostat on obtient un marquage aussi bien des granulations que du cytoplasme et des membranes ergastoplasmiques.

- d'autre part, avec la technique au P.A.P. sur coupe

ultrafine, on observe exclusivement (à l'exception des cellules corticotropes) un marquage sur les granulations.

La plus grande concentration de sites s'observe au niveau des granulations (ce qui avait déjà été démontré). Par contre, il paraît difficile actuellement de se prononcer sur l'existence ou non d'un pool extragranulaire d'hormone. A l'exception des cellules à prolactine et somatotropes où nous avons mentionné que Maurer et coll, 1977 (pp. ) avaient obtenu des résultats permettant d'expliquer un marquage des membranes ergastoplasmiques, il n'existe pas d'autres travaux qui peuvent résoudre ce problème.

En conclusion, nous avons décrit de façon précise différents types cellulaires d'adénohypophyses de deux mammifères dont l'étude au microscope électronique n'avait jamais été réalisée. Ce travail a été effectué dans des conditions non expérimentales grâce à l'utilisation de méthodes immunocyto-enzymatiques.