

50376
1980
216-1

50376
1980
216-1

N° d'ordre 500

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée

à l'Université des Sciences et Techniques de Lille

pour obtenir

le grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

Gérard TRAMU

**Détection Immunocytologique des Polypeptides
apparentés à la Corticotropine et à la
Bêta-Lipotropine dans l'Adénohypophyse
et l'Hypothalamus du Cobaye (*Cavia porcellus* L.)
et du Lérot (*Eliomys quercinus* L.)**

Tome I: TEXTE

soutenue le 10 Décembre 1980, devant la Commission d'Examen

MM. M. DURCHON	Président
A. DHAINAUT	Rapporteur
M.-P. DUBOIS	Rapporteur
J. LÉONARDELLI	Rapporteur
M ^{me} A. TIXIER-VIDAL	Examineur
M. J BARRY	Examineur

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, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A.LEBRUN.

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

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
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. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie Organique Biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. CHAPOTON Alain	Electronique

M.	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme	CORSIN Paule	Paléontologie
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
M.	CROSNIER Yves	Electronique
Mle	DACHARRY Monique	Géographie
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale
M.	DEMUNTER Paul	Sociologie
M.	DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M.	DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M.	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mle	DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
Mme	DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
M.	DORMARD Serge	Sciences Economiques
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertzienne
M.	DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertzienne
M.	DUEE Gérard	Géologie
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
Mme	EVARD Micheline	Chimie Appliquée
M.	FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M.	FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
M.	FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M.	GERVAIS Michel	Gestion
M.	GLORIEUX Pierre	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GREVET Patrick	Sciences Economiques
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M.	HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
M.	JACOB Gérard	Informatique
M.	JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
M.	JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M.	JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertzienne
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mme	LECLERCQ Ginette	Catalyse
Mle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mle	LEGRAND Solange	Algèbre
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertzienne
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M.	LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOSFELD Joseph	Informatique
M.	LOUAGE Francis	Electronique
M.	MACKE Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M ^{lle} MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
M ^{me} N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M ^{lle} PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie Animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie Structurale
M. RICHARD Alain	Biologie Animale
M. RIETSCH François	Physique des Polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
M ^{me} SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
M ^{lle} SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VERBERT André	Biochimie
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
M ^{me} ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

J'exprime tous mes remerciements,

à Monsieur BARRY, Professeur,

qui, en m'accueillant dans son laboratoire et en m'intégrant à son équipe, a permis la réalisation de ce travail. Son enthousiasme scientifique sera toujours pour moi, un exemple.

à Monsieur DURCHON, Professeur,

pour la bienveillante attention qu'il me témoigne en présidant le jury de cette thèse. Après avoir bénéficié de son enseignement, puis de ses encouragements, j'ai profité de ses conseils avisés lors de la rédaction des résultats.

à Monsieur DUBOIS, Directeur de recherches,

pour l'indispensable concours qu'il m'a toujours prodigué. Ses qualités humaines et sa compétence scientifique me rendent ses avis, précieux et je suis heureux de le compter aujourd'hui parmi mes juges.

à Madame TIXIER-VIDAL, Directeur de recherches,

qui a pris sur son temps en acceptant d'examiner mon travail. Sa compétence en Neuroendocrinologie est telle que je suis particulièrement honoré de sa présence dans le jury de cette thèse.

à Monsieur LEONARDELLI, Professeur,

que j'assure de mon attachement. Dans le travail comme dans les discussions, j'ai bénéficié de son dynamisme et du bon-sens de ses jugements.

à Monsieur DHAINAUT, Professeur,

qui a aimablement accepté d'être rapporteur d'un travail dont le sujet est assez éloigné de ses préoccupations de chercheur, mais dont certains aspects auront, je l'espère, attiré son attention.

Je tiens également à remercier J.C. BEAUVILLAIN et Dominique CROIX pour leur participation aux travaux concernant la localisation des enképhalines ;

A. PILLEZ pour son aide amicale toujours efficace.

S O M M A I R E

INTRODUCTION	P. 1
CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES	P. 5
A - CHOIX DES ANIMAUX ETUDIES	P. 6
B - OBTENTION DES IMMUNSERUMS	P. 8
1°) Origine des antigènes	P. 8
2°) Couplage des antigènes	P. 8
3°) Protocoles d'immunisation	P. 9
4°) Conservation des immunosérums	P. 11
C - SPECIFICITE DES IMMUNSERUMS	P. 11
1°) Tests réalisés <i>in vitro</i>	P. 12
a) Méthodes utilisant l'hémolyse	P. 12
1 - Fixation du complément	P. 12
2 - Immunohémolyse passive indirecte	P. 14
b) Tests radioimmunologiques	P. 19
2°) Tests immunohistologiques	P. 19
D - METHODES IMMUNOHISTOCHIMIQUES	P. 21
1°) Préparation du tissu	P. 21
a) Pour coupes à la paraffine	P. 22
1 - Choix d'un fixateur	P. 22
2 - Durée de la fixation et de l'inclusion	P. 24
3 - Coupes	P. 24
b) Pour coupes au cryostat	P. 24
c) Pour coupes semi-fines	P. 25
d) Pour coupes ultra-fines	P. 25
2°) Réactions immunohistochimiques utilisées seules	P. 26
a) Méthode indirecte	P. 27
1 - Application du sérum spécifique	P. 28
2 - Application du sérum marqué	P. 28
α) Sérum marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine	P. 29
β) Sérum marqué à la peroxydase	P. 29
3 - Cas particulier de la méthode indirecte sur coupes semi-fines	P. 31
4 - Remarques concernant l'utilisation de la méthode indirecte	P. 32
b) Méthode dite "du pont"	P. 32
c) Méthode du PAP	P. 34
1 - Principe et intérêt	P. 34
2 - Utilisation du PAP en microscopie photonique	P. 35
3 - Utilisation du PAP en microscopie électronique ..	P. 37

d) Méthodologies appliquées dans le but d'un examen en microscopie électronique	P. 38
1 - Méthode avant enrobage	P. 38
2 - Méthode après enrobage	P. 40
e) Contrôle de la spécificité des marquages	P. 41
3°) Réactions immunohistochimiques en utilisation combinée ou successive	P. 41
a) Nécessité de l'éluion	P. 43
b) Elution et contrôle d'efficacité	P. 44
c) Technique utilisant le traitement d'éluion	P. 45
1 - Mise en évidence successive de deux antigènes	P. 45
2 - Mise en évidence simultanée de deux antigènes	P. 46

CHAPITRE 2 : HORMONES POLYPEPTIDIQUES ET SUBSTANCES APPARENTEES DANS
L'ADENOHYPOPHYSE

I - CORTICOTROPINE ET MELANOTROPINES

A - ETAT DES CONNAISSANCES

B - RECHERCHES PERSONNELLES

1°) Reconnaissance immunohistochimique des cellules cortico- tropes	P. 52
a) Caractères tinctoriaux et histochimiques	P. 52
1 - Chez le Lérot	P. 52
2 - Chez le Cobaye	P. 52
b) Caractères ultrastructuraux	P. 53
2°) Répartition des cellules fixant les anticorticotropines ..	P. 53
a) Chez le Cobaye	P. 53
1 - Anticorps dirigés contre la moitié COOH terminale de l'ACTH	P. 53
2 - Anticorps dirigés contre la moitié NH ₂ terminale de l'ACTH	P. 54
3 - Anticorps dirigés contre le tronçon médian 11-24 ACTH	P. 55
4 - Différences individuelles dans les marquages anti- corticotropine	P. 55
b) Chez le Lérot	P. 56
1 - Anticorps dirigés contre la moitié NH ₂ terminale de l'ACTH	P. 56
2 - Anticorps dirigés contre la moitié COOH terminale de l'ACTH	P. 56
3 - Cellules corticotropes au cours du cycle annuel ..	P. 57
3°) Répartition des cellules fixant les antimélanotropines ...	P. 58

a) Chez le Cobaye	P. 58
1 - Anticorps dirigés contre l' α -MSH	P. 58
2 - Anticorps dirigés contre la β -MSH	P. 58
b) Chez le Lérot	P. 59
1 - Anticorps dirigés contre l' α -MSH	P. 59
2 - Anticorps dirigés contre la β -MSH	P. 60
4°) Répartition des cellules fixant les anticorps dirigés contre le 4-10ACTH	P. 60
a) Chez le Cobaye	P. 60
b) Chez le Lérot	P. 61
5°) Comparaisons entre certaines réactions précédemment décrites	P. 61
a) Réactions anti-corticotropines dans le lobe antérieur	P. 62
1 - Chez le Cobaye	P. 62
2 - Chez le Lérot	P. 62
b) Réactions anti-corticotropines dans le lobe intermé- diaire	P. 63
1 - Chez le Cobaye	P. 63
2 - Chez le Lérot	P. 63
c) Comparaisons entre les marquages anti- α -MSH et anti- ACTH dans le lobe intermédiaire	P. 64
1 - Chez le Cobaye	P. 64
2 - Chez le Lérot	P. 65
d) Comparaison entre les marquages anti- α -MSH et anti-4- 10ACTH chez le Cobaye	P. 65
e) Comparaison entre marquage anti-4-10ACTH et anti-ACTH chez le Lérot	P. 66
C - DISCUSSION	P. 67
1°) Spécificité des immunosérums	P. 67
2°) ACTH dans le lobe antérieur	P. 70
3°) ACTH dans le lobe intermédiaire	P. 71
4°) β -mélantropine immunoréactive	P. 73
5°) Localisation de l' α -mélantropine	P. 76
6°) Marquage anti-4-10ACTH	P. 77
II - ENDORPHINES	P. 79
A - ETAT DES CONNAISSANCES	P. 79
B - RECHERCHES PERSONNELLES	P. 82
1°) Répartition des cellules fixant les anti-endorphines	P. 82
a) Chez le Cobaye	P. 82
b) Chez le Lérot	P. 83
2°) Répartition des cellules fixant les anti-lipotropines ...	P. 83
a) Réactions anti- β -LPH bovine	P. 83
b) Réactions anti- γ -LPH bovine	P. 84

3°) Comparaison des réactions anti-endorphines avec les réactions anti-ACTH et anti-MSH	P. 84
a) Dans le lobe antérieur	P. 84
b) Dans le lobe intermédiaire	P. 84
C - DISCUSSION	P. 86
III - ENKEPHALINES	P. 89
A - ETAT DES CONNAISSANCES	P. 89
B - RESULTATS	P. 91
1°) Chez le Cobaye	P. 91
a) Microscopie photonique	P. 91
b) Microscopie électronique	P. 94
1 - Méthode de marquage avant enrobage	P. 94
2 - Méthode de marquage après enrobage	P. 95
2°) Chez le Rat	P. 96
C - DISCUSSION	P. 99
1°) Spécificité des marquages	P. 99
2°) Localisation intracellulaire du marquage	P. 99
3°) Signification des enképhalines dans l'adénohypophyse	P. 100
4°) Enképhalines et sécrétions hypophysaires	P. 102
5°) Cellules hypophysaires réagissant aux anti-enképhalines .	P. 103
6°) Localisation granulaire des enképhalines	P. 105
IV - CONCLUSIONS	P. 107
CHAPITRE 3 : POLYPEPTIDES APPARENTES A L'ACTH ET A LA β -LPH DANS L'HYPOTHALAMUS	P. 112
I - CORTICOTROPINE, MELANOTROPINES ET ENDORPHINES	P. 113
A - ETAT DES CONNAISSANCES	P. 113
B - RESULTATS	P. 115
1°) Immunoréactivité anti-ACTH COOH terminale et anti- β -endorphine des neurones hypothalamiques à LH-RH	P. 115
a) ACTH-COOH-terminal	P. 115
b) β -endorphine	P. 119
2°) Immunoréactivité anti-(ACTH, MSH, endorphines) de neurones de l'hypothalamus médiobasal	P. 121
a) Description du système formé par les neurones immunoréactifs	P. 121
b) Déterminants antigéniques présents dans ce système de neurones	P. 122
C - DISCUSSION	P. 123

II - ENKEPHALINES	P. 131
A - ETAT DES CONNAISSANCES	P. 131
B - RESULTATS	P. 133
1°) Spécificité des immunsérums	P. 133
2°) Marquages anti-enképhaline dans l'hypothalamus	P. 134
a) Fibres et terminaisons nerveuses	P. 134
1 - Dans l'éminence médiane	P. 134
α) Microscopie photonique	P. 134
β) Microscopie électronique	P. 136
2 - Dans l'hypothalamus médiobasal	P. 137
b) Péricaryons	P. 138
1 - Dans l'hypothalamus périventriculaire antérieur .	P. 138
2 - Dans l'hypothalamus médiodorsal	P. 139
3 - Dans l'hypothalamus médioventral	P. 140
4 - Ailleurs dans l'hypothalamus	P. 141
3°) Marquages anti-enképhaline autours de l'hypothalamus	P. 141
a) Dans le septum	P. 141
b) Dans le noyau accumbens et le lit de la strie terminale	P. 142
c) Dans l'aire préoptique	P. 142
d) Dans le globus pallidus	P. 144
e) Dans le thalamus	P. 144
C - DISCUSSION	P. 145
III - CONCLUSIONS	P. 151
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES.....	P. 153
	158
BIBLIOGRAPHIE	P. 159
FIGURE 1	P. 7
FIGURE 2	P. 13
FIGURE 3	P. 14
FIGURE 4	P. 15
FIGURE 5	P. 16
FIGURE 6	P. 18
FIGURE 7	P. 26
FIGURE 8	P. 27
FIGURE 9	P. 30
FIGURE 10	P. 33
FIGURE 11	P. 35
FIGURE 12	P. 43
FIGURE 13	P. 68
FIGURE 14	P. 69
FIGURE 15	P. 108
FIGURE 16	P. 124
FIGURE 17	P. 127
FIGURE 18	P. 143

TABLEAU I	P. 17
TABLEAU II	P. 20
TABLEAU III	P. 23
TABLEAU IV	P. 88
TABLEAU V	P. 98
TABLEAU VI	P. 116

LEGENDES PLANCHES I à XLII	TOME 2
----------------------------------	--------



A B R E V I A T I O N S

Ac, anticorps
ACTH, corticotropine (adrenocorticotropic hormone)
Ag, antigène
BSA, sérumalbumine bovine (bovine serumalbumin)
CRF, corticolibérine (corticotropin-releasing factor)
CLIP, corticotropin-like intermediate lobe peptide
DAB, diaminobenzidine
FSH, follitropine (follicle-stimulating hormone)
GH, somatotropine (growth hormone)
HCG, gonadotropine chorionique humaine (human chorionic gonadotropin)
HSA, sérumalbumine humaine (human serumalbumin)
LH, lutropine (luteinizing hormone)
LH-FSH-RH, gonadolibérine (LH-FSH-releasing hormone)
LPH, lipotropine (lipotropic hormone)
MSH, mélanotropine (melanocyte-stimulating hormone)
PAF, picric acid-formaldehyde
PAP, peroxydase-anti-peroxydase
PAS, perodic acid-Schiff
PIF, prolactostatine (prolactin release-inhibiting factor)
PRL, prolactine
OVLТ, organe vasculaire de la lame terminale
TRH, thyrolibérine (thyrotropin-releasing hormone)
TSH, thyrotropine (thyroid-stimulating hormone)

INTRODUCTION

C'est par l'intermédiaire d'un certain nombre d'hormones stimulantes que l'hypophyse glandulaire tient sous sa dépendance chacune des grandes fonctions endocrines périphériques ainsi que la croissance et la fonction lactogène.

D'un point de vue chimique, les hormones adénohypophysaires sont des protéines et se répartissent en hormones glycoprotéiques (FSH, LH et TSH), hormones protéiques (GH et PRL) et hormones polypeptidiques. Cette dernière catégorie qui fait l'objet de ce travail, regroupe des substances dont les molécules sont formées d'une chaîne simple d'acides aminés sans résidu cystéine donc sans pont disulfure. Telles sont les molécules de l'hormone corticotrope ou corticotropine (ACTH) et d'entités peptidiques au rôle beaucoup moins défini comme les mélanotropines (α - et β -MSH) et la β -lipotropine (β -LPH) et ses dérivés.

La détermination de l'origine cellulaire des différentes stimulines a progressé parallèlement aux connaissances sur leur rôle et leur nature chimique. Le nombre considérable des travaux qui se sont attachés à la caractérisation morphologique et fonctionnelle des types cellulaires de l'adénohypophyse ainsi que la diversité de leurs conclusions, témoignent de la complexité du problème et des limites de la méthodologie employée. Les premiers résultats importants furent apportés par l'examen histologique des tumeurs pituitaires humaines avec l'individualisation de l'adénome acidophile d'acromégalie (BENDA, 1901) et de l'adénome basophile accompagnant un hypercorticisme (CUSHING, 1932). Les recherches s'appuyèrent également sur des expérimentations animales mettant en jeu la rétroaction de l'hormone produite par la glande endocrine cible sur la cellule hypophysaire. L'affinage des techniques de coloration, d'histochimie et de microscopie électronique dont GIROD (1976) fait un exposé complet, permet de dégager un concept fortement étayé par l'aspect de mosaïque cellulaire que revêt l'adénohypophyse : chaque type cellulaire morphologiquement individualisable est responsable de la sécrétion d'une hormone donnée possédant une action

biologique précise. Plus schématiquement exprimée, il se traduit par la formule : "une cellule, une hormone".

Cependant, des imprécisions persistaient, tout particulièrement en ce qui concerne les cellules responsables de la sécrétion des hormones polypeptidiques. C'est la mise en pratique des méthodes immunohisto-chimiques qui devait lever les dernières incertitudes sur la fonction de chacun des types cellulaires. Elle devait introduire aussi une importante notion nouvelle qui, sans l'infirmier, bousculait le principe "une cellule, une hormone" : une même cellule peut en effet, synthétiser plusieurs entités hormonales chimiquement proches. Ainsi, de même qu'un seul type cellulaire fut progressivement reconnu comme source des deux gonadotropines LH et FSH (TOUGARD et coll., 1971, 1973 HERBERT et coll., 1975, 1976), ACTH et MSH furent localisés dans la même cellule (DUBOIS, 1972 ; PHIFER et coll., 1974). De plus, il fut montré (MOON et coll., 1973) que cette cellule corticomélanotrope contenait aussi la β -lipotropine (β -LPH), polypeptide hypophysaire à activité lipolytique isolé en 1964 par BIRK et LI. Dans la chaîne des 91 AA constituant la β -LPH, se trouve la séquence complète de β -MSH. Ces dernières années, plusieurs peptides dont les séquences sont incluses dans le fragment C-terminal de la β -LPH, ont été individualisés. Il s'agit des endorphines (COX et coll., 1975, 1976) et des enképhalines (HUGHES, 1975 a, b, c). L'immunohistochimie a permis de montrer que les endorphines sont présentes dans les cellules élaborant ACTH, MSH et LPH (BLOOM et coll., 1977 ; BEGEOT et coll., 1978).

Il apparaît donc que le type cellulaire auquel, quelques années auparavant on n'attribuait que la sécrétion d'ACTH, est en fait responsable de l'élaboration de nombreuses substances chimiquement voisines de la corticotropine mais dont l'action biologique n'a rien à voir avec celle de cette dernière. La présence simultanée dans une même cellule, de peptides dont la liste ne fait que s'allonger, est très certainement à rapprocher de résultats immunochimiques démontrant que la cellule corticotrope synthétise un "big ACTH" (YALOW et BERSON, 1971) et plus précisément une grosse molécule jouant le rôle de précurseur pour l'ACTH et la β -LPH (MAINS et coll., 1977).

La deuxième partie de ce travail aborde par la voie morphologique l'intéressant problème de la présence dans l'hypothalamus de peptides appartenant à la famille de l'ACTH. La corticotropine a été localisée dans le diencéphale, aussi bien par dosage (KRIEGER et coll., 1977 a, b) que par immunocytochimie (TRAMU et coll. 1977 ; LARSSON, 1977 et 1978). Les publications récentes ainsi que nos propres résultats tendent à prouver que l'ACTH hypothalamique est lui aussi, associé à des peptides proches des mélanotropines et de la β -LPH. Il est à remarquer que, d'un point de vue théorique, la présence d'ACTH et MSH dans le cerveau n'a pas un caractère vraiment inattendu. En effet, l'intervention de ces hormones dans les phénomènes comportementaux et d'apprentissage avait déjà été mise en évidence (DE WIED, 1976). Il est cependant probable que leurs influences sur la mémorisation ne représentent qu'un aspect des effets de ces peptides sur le système nerveux central. Leur signification fonctionnelle exacte reste donc à définir et le problème de leur origine à résoudre. Ces peptides proviennent-ils de l'hypophyse comme le suggèrent leur nature chimique et la présence toute proche de la glande, ou au contraire sont-ils synthétisés par certains neurones hypothalamiques ?

Dans cet exposé, nous nous efforcerons, par des résultats immunomorphologiques d'apporter une contribution à la connaissance du précurseur des ACTH, MSH et LPH et d'aborder le problème de la signification fonctionnelle de ce polypeptide et de ses dérivés, aussi bien dans l'hypophyse que dans le cerveau.

CHAPITRE I

MATERIEL et METHODES

A - CHOIX DES ANIMAUX ETUDIÉS

C'est essentiellement chez le Cobaye que les recherches de notre laboratoire sur le contrôle hypothalamique des fonctions adénohypophysaires, sont effectuées depuis plusieurs années. Personnellement, nous connaissons bien la cytologie hypophysaire de cet animal, et aucune étude immunocytoologique systématique des sécrétions cortico-mélano-lipotropes n'ayant été conduite sur son hypophyse, notre choix s'est naturellement porté sur cette espèce.

Le Lérot était également étudié dans le laboratoire en raison de son cycle génital annuel très marqué de Mammifère Hibernant. Son hypophyse présentant la particularité de posséder un lobe intermédiaire très réduit, il nous a semblé intéressant de la comparer à celle du Cobaye. En ce qui concerne le développement relatif des trois lobes, l'hypophyse du Cobaye figure en effet le cas le plus courant chez les mammifères (voir LEGAIT, 1963) alors que le lobe intermédiaire du Lérot, représente moins de 1 p. 100 du volume total de la glande (LEGAIT et coll., 1970). Les vues schématisées en coupe sagittale des hypophyses de Cobaye et de Lérot peuvent être comparées sur la figure 1.

Dans chaque espèce, les animaux étudiés ont toujours été des adultes normaux de l'un ou l'autre sexe. En outre, les hypophyses de six cobayes femelles en fin de gestation, récupérées sur des animaux sacrifiés en vue d'une détermination des taux de gonadotropines plasmatiques (JENNES et CROIX, 1980), ont aussi été examinées. Dans l'ensemble des travaux exposés ici, environ soixante Cobayes ont été utilisés : 20 mâles d'un poids variant de 450 à 600 g et 40 femelles d'un poids comparable. Les individus femelles ont été sacrifiés de façon que chaque phase du cycle oestral soit représentée. 6 animaux étaient en état de gestation dont le terme était prévu dans les trois jours à venir.

REMARQUE : 12 animaux utilisés pour l'étude de la présence dans l'hypothalamus de polypeptides apparentés à l'ACTH et à la β -LPH, avaient préalablement été traités par la colchicine : 48 heures avant le sacrifice, ils avaient reçu dans le ventricule cérébral latéral, en injection lente (10mn), 200 μ g de colchicine dissous dans 50 μ l de sérum physiologique. Ce traitement utilisé par BARRY et coll. (1973 a et b) pour la localisation des neurones à LH-RH a pour effet d'augmenter la quantité de matériel sécrétoire dans le péricaryon du neurone et donc de permettre une meilleure visualisation de ce dernier par immunohistochimie.

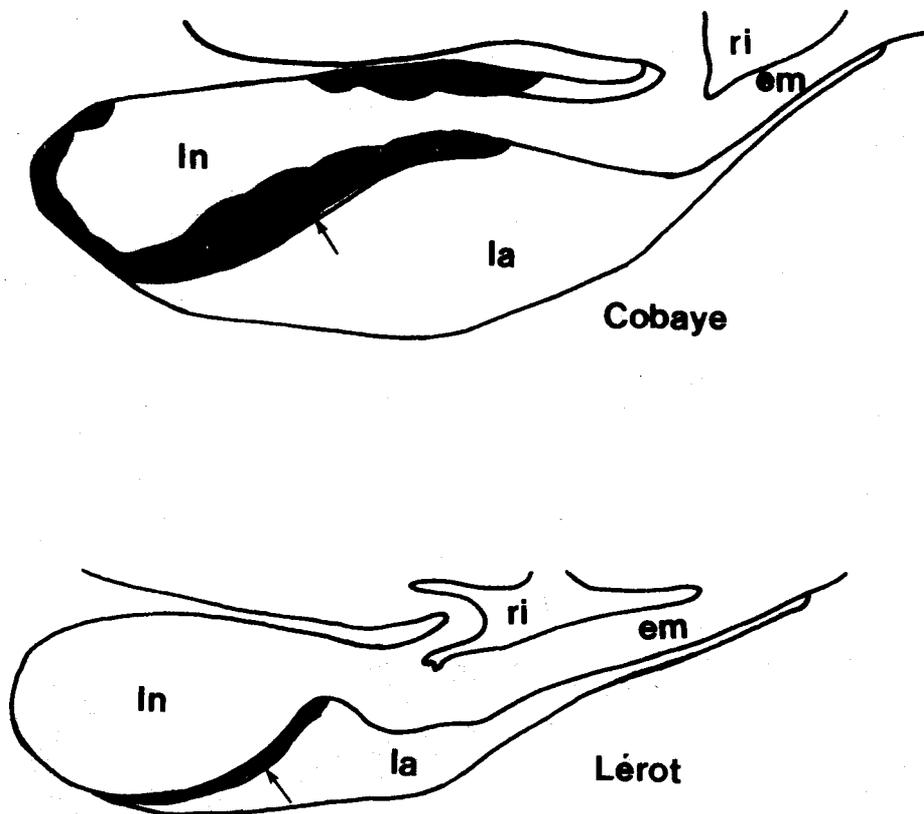


Fig. 1 : Représentation schématique en coupe sagittale de l'hypophyse du Cobaye et de celle du Lérot. Le lobe intermédiaire (en noir) est délimité par la fente hypophysaire (flèche) d'une part et le lobe nerveux (ln) d'autre part.
la : lobe antérieur ; ri : récessus infundibulaire ; em : éminence médiane.

En ce qui concerne le Lérot, 120 animaux au total ont été étudiés. Cependant, l'examen systématique de l'hypophyse n'a porté que sur 40 individus considérés comme représentants typiques d'une phase du cycle annuel. Les dates de sacrifice ont été échelonnées tout au long de l'année. 22 des animaux étaient en état d'hibernation.

B - OBTENTION DES IMMUNSERUMS

Les immunosérums, pour la plupart, sont dus à l'obligeance du Dr DUBOIS (INRA, Nouzilly). Cependant, parmi ceux qui ont été utilisés dans ce travail, nous avons produit un anti-1-24ACTH (69), un anti- β -endorphine (90), un anti-leucine-enképhaline (L), deux anti-méthionine-enképhaline (M et M1) et deux anti-LH-RH (82 et 83).

1°) Origine des antigènes

Dans leur grande majorité, les antigènes employés pour immuniser les lapins sont de nature synthétique. Il s'agit de petits polypeptides qui sont synthétisés soit dans un but thérapeutique (1-24ACTH ou Synacthène CIBA-GEIGY), soit dans un but de recherche. Les laboratoires CIBA nous ont fourni gracieusement plusieurs milligrammes de 1-24ACTH, α -MSH, 4-10ACTH, 1-16ACTH. Tous les immunosérums anti-ACTH et anti-MSH ont été élaborés à partir d'antigènes synthétiques CIBA.

Les anti-LPH, deux anti- β endorphine (19645 et 19646) et l'anti- α endorphine proviennent de lapins immunisés avec des antigènes d'extraction. Les γ et β -LPH sont un don du Pr. L. GRAF (Budapest) et les endorphines α et β sont dues à l'obligeance du Pr. R. GUILLEMIN (La Jolla, Californie).

L'immunosérum anti- β -endorphine (90), les anti-enképhalines (L, M et M1) ainsi que les anti-LH-RH (82 et 83) ont été produits à partir de peptides synthétiques disponibles chez SERVA Heidelberg.

2°) Couplage des antigènes

L'antigénicité d'une protéine, est en grande partie dépendante de sa taille et l'on admet généralement qu'un polypeptide d'un poids moléculaire inférieur à 10 000 est peu, voire pas immunogène. Les peptides synthétiques étant précieux, il convient de ménager les quantités nécessaires à l'immunisation.

Dans ce but et dans celui d'augmenter la réponse immunitaire, le peptide-antigène est couplé à une protéine porteuse (généralement albumine) par l'intermédiaire d'un agent couplant : le glutaraldéhyde selon la technique de VANCE et coll., 1968 ou la carbodiimide (SKOWSKY et FISCHER, 1972). A titre d'exemple, nous reproduisons ci-dessous le processus de couplage utilisé pour préparer l'antigène enképhaline-albumine.

- 15 mg de sérum albumine humaine sont dissous dans 1,5 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2*

*Tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2 : H₂O distillée : 1 litre
Na₂HPO₄ anhydre 1,07 g
NaH₂PO₄, 2H₂O 0,39 g

- 5 mg d'enképhaline sont dissous dans 1 ml de sérum physiologique,
- les deux solutions sont mélangées et sous agitation constante on y ajoute goutte à goutte 1 ml d'une solution de glutaraldéhyde 0,02 M dans le tampon phosphate. L'agitation est maintenue trois heures à la température du laboratoire,
- le glutaraldéhyde est inhibé par addition de 0,75 mg de Na₂S₂O₅ dans 0,5 ml de tampon,
- l'ensemble est dialysé pendant 48 heures contre une solution à 0,9 p. 100 de chlorure de sodium,
- le volume du dialysat est ajusté à 5 ml et réparti en 10 doses de 500 µl qui seront conservées à - 20°C jusqu'à utilisation.

3°) Protocoles d'immunisation

Avant inoculation, l'antigène couplé est soigneusement émulsionné avec un volume égal d'adjuvant complet de Freund. Nous avons le plus souvent combiné deux méthodes donnant de bons résultats : la méthode par injections intradermiques multiples (VAITUKAITIS et coll., 1971) et la méthode par injection intrasplénique unique (DUBOIS et RENOUX, 1971).

Pour l'immunisation de quatre lapins contre les enképhalines, nous avons suivi le protocole suivant :

a) Premier jour

Le même jour chaque animal reçoit deux doses émulsionnées, soit un volume de 2 ml.

- 1 - Sur l'animal anesthésié au Nembutal (5 mg/kg), une incision abdominale est pratiquée. Dans la rate mise à nu, un volume de 0,5 ml d'émulsion est injecté. La blessure est délicatement tamponnée de Coalgan.
- 2 - Sur le dos préalablement tondu, le volume restant (soit 1,5 ml) de l'émulsion est réparti, en une quarantaine d'injections intradermiques.
- 3 - L'animal reçoit de plus une dose de 1 ml de vaccin anticoquelucheux (PERTHYDRAL. Institut Pasteur).

b) Rappels :

- 15 jours après, chaque lapin reçoit en rappel, une dose émulsionnée (soit 1 ml) en injections intradermiques multiples.
- 3 semaines après ce premier rappel, une autre dose émulsionnée est administrée dans les mêmes conditions.
- 3 semaines après ce deuxième rappel une autre dose est injectée, toujours dans les mêmes conditions.
- 1 mois après ce troisième rappel, par voie intraveineuse, une dose non émulsionnée est injectée dans la veine marginale de l'oreille.
- Le 5ème et 7ème jour suivant cette injection intraveineuse, chaque animal est saigné à l'oreille. 30 ml de sang sont prélevés à chacune des saignées.

c) Reprise des rappels

Après un repos d'un mois, les lapins reçoivent une dose émulsionnée administrée en injections intradermiques multiples.

Un mois après cette série d'injections, une dose non émulsionnée est injectée par voie veineuse et les animaux sont saignés comme précédemment cinq et sept jours après ce dernier rappel.

Les rappels sont repris de la même façon après des périodes de repos plus ou moins longues.

4°) Conservation des immunsérums

En général, les sérums sont stockés par petites quantités de 0,5 ml ou 1 ml à -20°C. A cette température, nous pratiquons également le stockage du sérum après qu'il ait été additionné d'un volume égal de glycérine pure. Cette façon de procéder, qui apparemment ne nuit en rien à l'affinité du sérum pour l'antigène, a un avantage notable : à - 20°C, le mélange sérum-glycérine reste liquide, ce qui permet son prélèvement par pipetage pour réaliser les dilutions d'emploi, et évite les décongélations successives qui risqueraient d'entraîner une baisse du titre en anticorps.

Certains lots ont aussi été lyophilisés en ampoules de verre qui sont scellées après l'opération.

C - SPECIFICITE DES IMMUNSERUMS

Le problème est de s'assurer que le marquage sur coupe révèle bien la présence de l'antigène recherché. Les artéfacts susceptibles de survenir peuvent soit être d'ordre immunologique (caractéristiques des sites anticorps eux-mêmes), soit avoir une origine mécanique ou physique (adsorption des immunoglobulines ou du marqueur). Les réactions aspécifiques d'adsorption seront abordées dans l'exposé des méthodes immunocytologiques (D, 2°, e).

Ce paragraphe traitera des tests réalisés sur les immunsérums dans le but d'apprécier le degré de spécificité de leur liaison avec l'antigène homologue et donc les éventuelles réactions croisées qu'ils pourraient avoir avec des antigènes chimiquement voisins de l'antigène qui les a induits.

1°) Tests réalisés in vitro

a) Méthodes utilisant l'hémolyse

1 - Fixation du complément et inhibition de cette fixation

Le principe consiste à mettre en présence, dans un premier temps, l'immunsérum à concentration fixe, l'antigène à concentration variable et le complément. Dans un deuxième temps sont rajoutés à ce système des hématies de mouton et un sérum hémolytique.

Le complément n'étant fixé qu'à l'équivalence, l'hémolyse traduit d'abord un excès d'anticorps puis un excès d'antigène (voir l'exemple donné fig. 2).

Le test d'inhibition de la fixation du complément par des substances proches de l'antigène, se réalise à l'équivalence antigène-anticorps, c'est-à-dire dans des conditions où l'hémolyse est nulle. La substance proche de l'antigène est introduite à concentration croissante. Lors du deuxième temps, quand hématies et sérum hémolytique sont ajoutés, l'apparition d'une hémolyse signale un excès d'antigène, autrement dit que la substance chimiquement proche de l'antigène joue le même rôle que lui, donc que cette substance fixe l'anticorps (fig. 3).

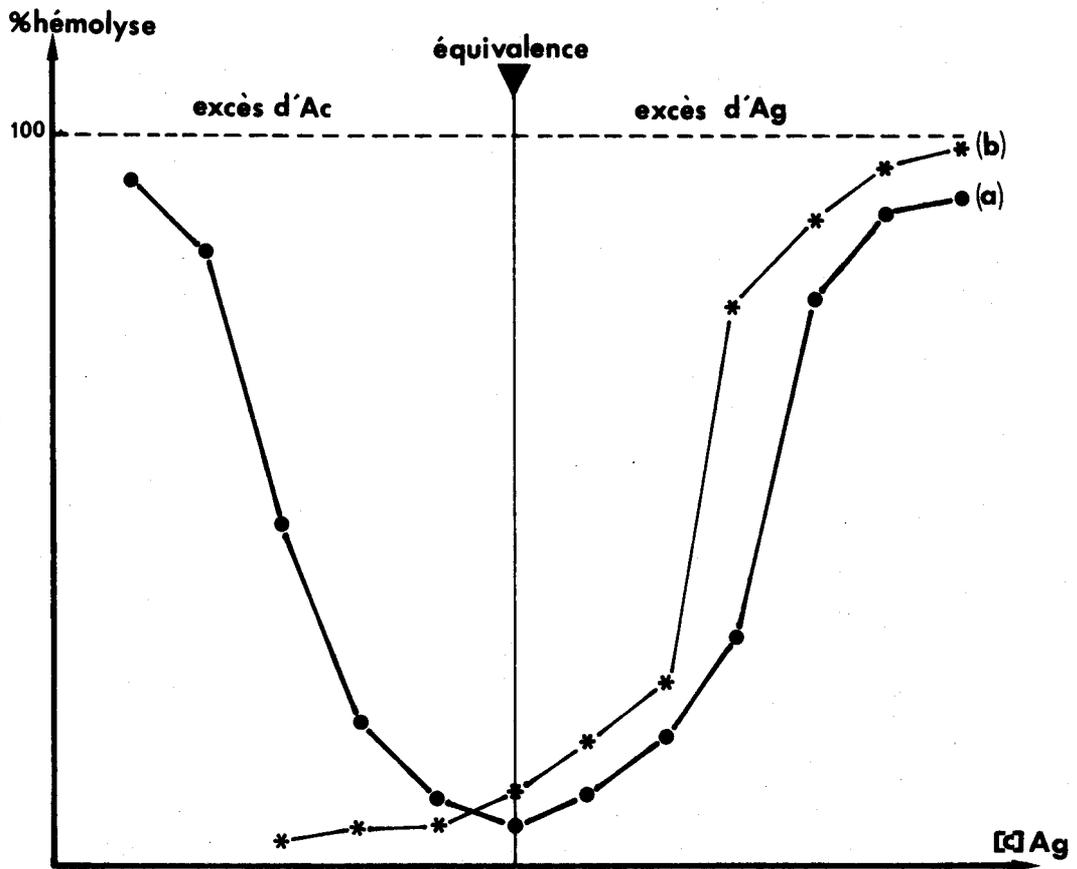


Fig. 2 : (a) : Fixation du complément au cours de la réaction entre l'anticorps anti-1-24ACTH-BSA et l'antigène 1-24ACTH.
(b) : Inhibition de la fixation maximum du complément par l'ACTH porcine.

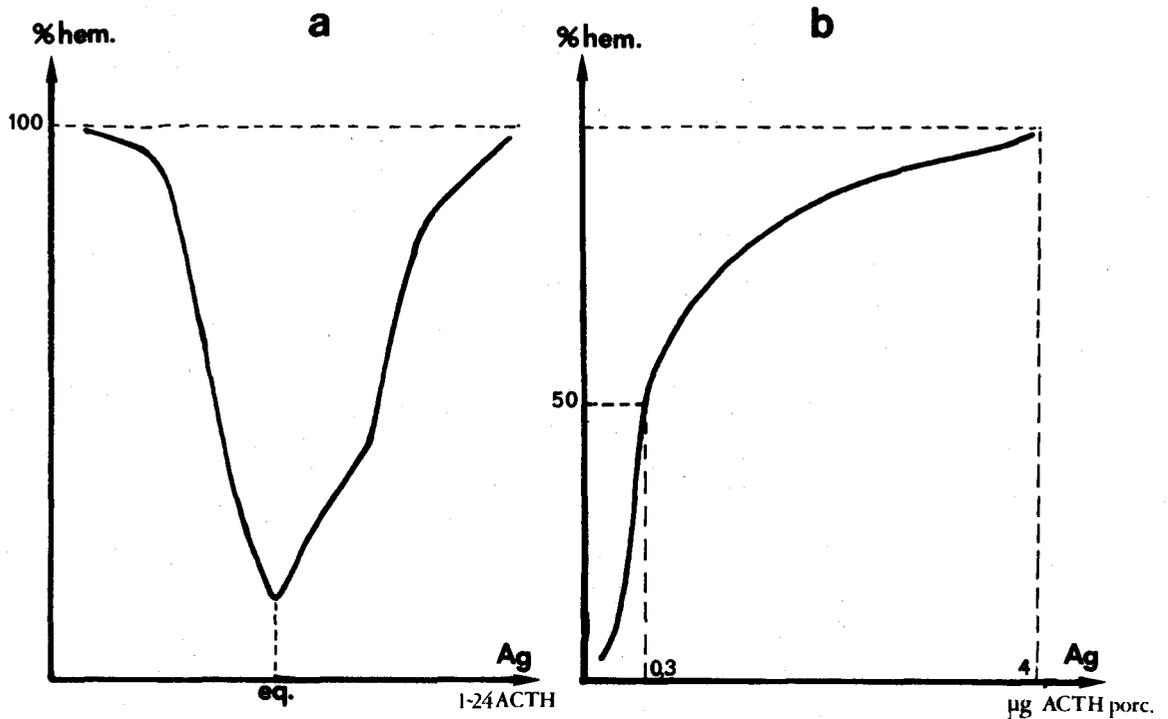


Fig. 3 : (a) : Courbe de fixation du complément au cours de la réaction anticorps anti-1-24ACTH-BSA (saturé BSA) et antigène 1-24ACTH-BSA.
(b) : Inhibition de la fixation du complément par l'ACTH porcine.

2 - Immuno-hémolyse passive indirecte (RANGEL et REPKA, 1965 ; RANGEL (1968)

L'immunsérum à concentration croissante est mis au contact d'hématies sensibilisées à l'antigène. En présence de complément, la réaction antigène-anticorps se traduit par une hémolyse. Cette méthode permet d'évaluer le titre en anticorps du sérum et de détecter d'éventuelles réactions croisées quand les hématies sont sensibilisées à des substances chimiquement proches de l'antigène. Le titre en anticorps est donné par la concentration en immunsérum déterminant l'hémolyse 50 p. 100. Ce point est conventionnellement choisi dans une zone où la courbe d'hémolyse a une pente régulière (fig. 4 et fig. 5).

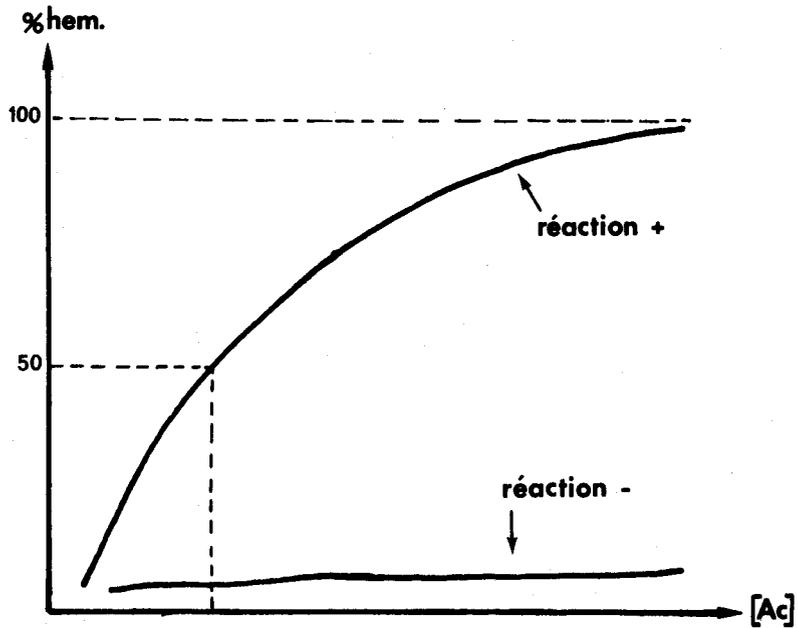


Fig. 4 : Courbe d'une réaction d'immunohémolyse passive indirecte

Tous les sérums utilisés dans ce travail ont été testés par cette méthode. Nous l'avons personnellement appliquée à l'étude du sérum anti-1-24ACTH n° 69 et des sérums anti-enképhalines L, M et M1. La figure 5 montre l'exemple des courbes obtenues en mettant en présence d'une part des hématies sensibilisées à la leucine-enképhaline, la méthionine-enképhaline ou l' α -endorphine et d'autre part, le sérum anti-leucine-enképhaline (L).

Les résultats concernant les trois sérums testés sont résumés dans le tableau I. La fraction indique la concentration en immunsérum nécessaire à l'obtention de l'hémolyse 50 p. 100.

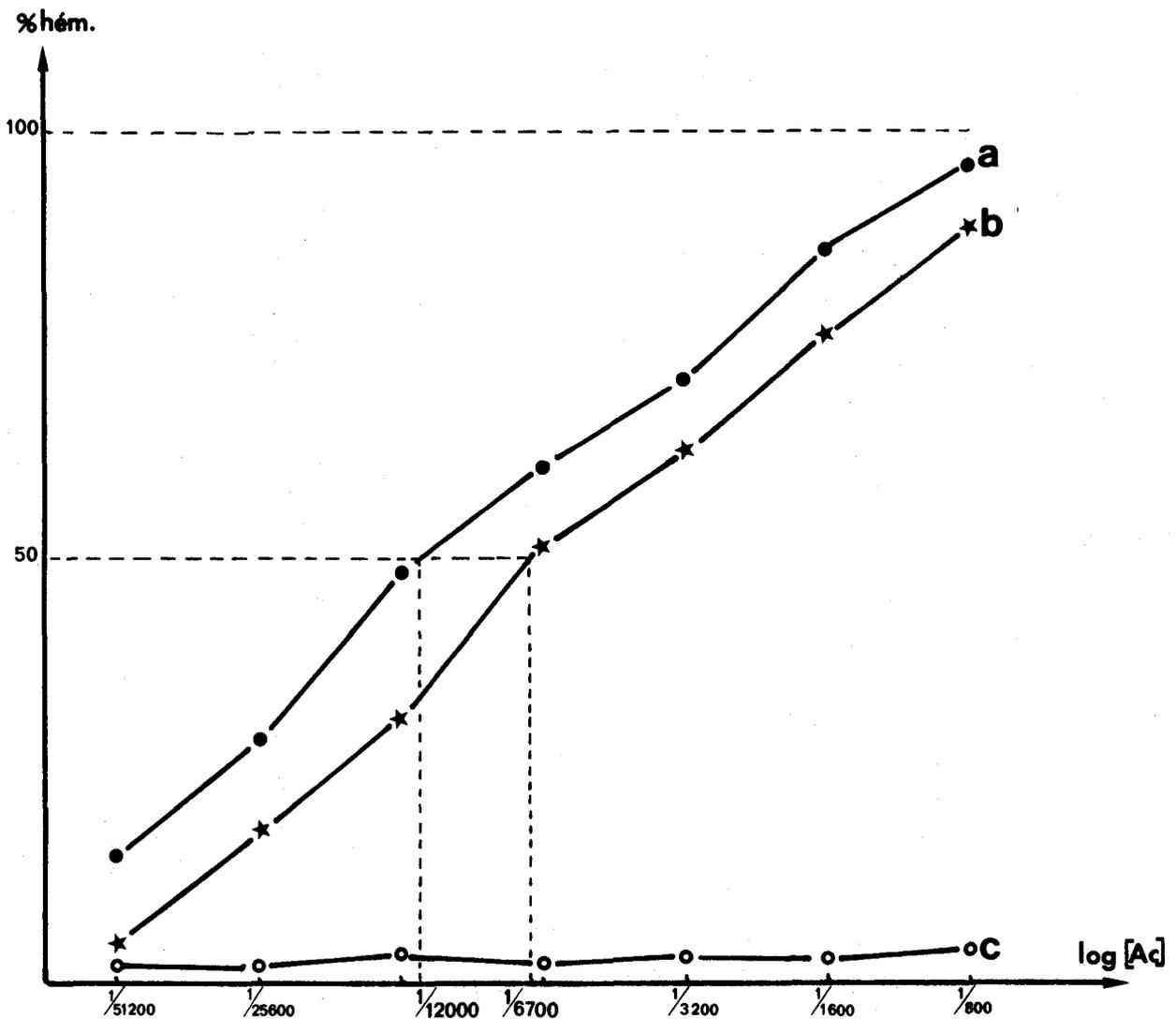


Fig. 5 : (a) : Anti-leucine-enképhaline et hématies sensibilisées par la leucine-enképhaline. Hémolyse 50 p. 100 : 1/12000.
(b) : Anti-leucine-enképhaline et hématies sensibilisées par la méthionine-enképhaline. Hémolyse 50 p. 100 : 1/6700.
(c) : Anti-leucine-enképhaline et hématies sensibilisées par l' α -endorphine. Pas d'hémolyse.

Immunsérums Hématies sensibilisées à	Anti-leu-enk L	Anti-met-enk M	Anti-met-enk M1
Leucine-enképhaline	1/12000	1/75*	1/850
Méthionine-enképhaline	1/6700	1/5600	1/8700
α -endorphine	X	X	X

Tableau I : Immunohémolyse passive indirecte. Evaluation du titre des immunsérums anti-enképhaline et de leurs réactions croisées avec l'enképhaline hétérologue et l' α -endorphine.

* = non significatif

~~X~~ = absence d'hémolyse

La figure 6 indique les réactions de deux immunsérums utilisés dans ce travail (anti- α - et β -MSH) et d'hématies sensibilisées par α -, β -MSH, 1-24ACTH ou β -LPH. Ces résultats nous ont été aimablement fournis par le Docteur M.P. DUBOIS.

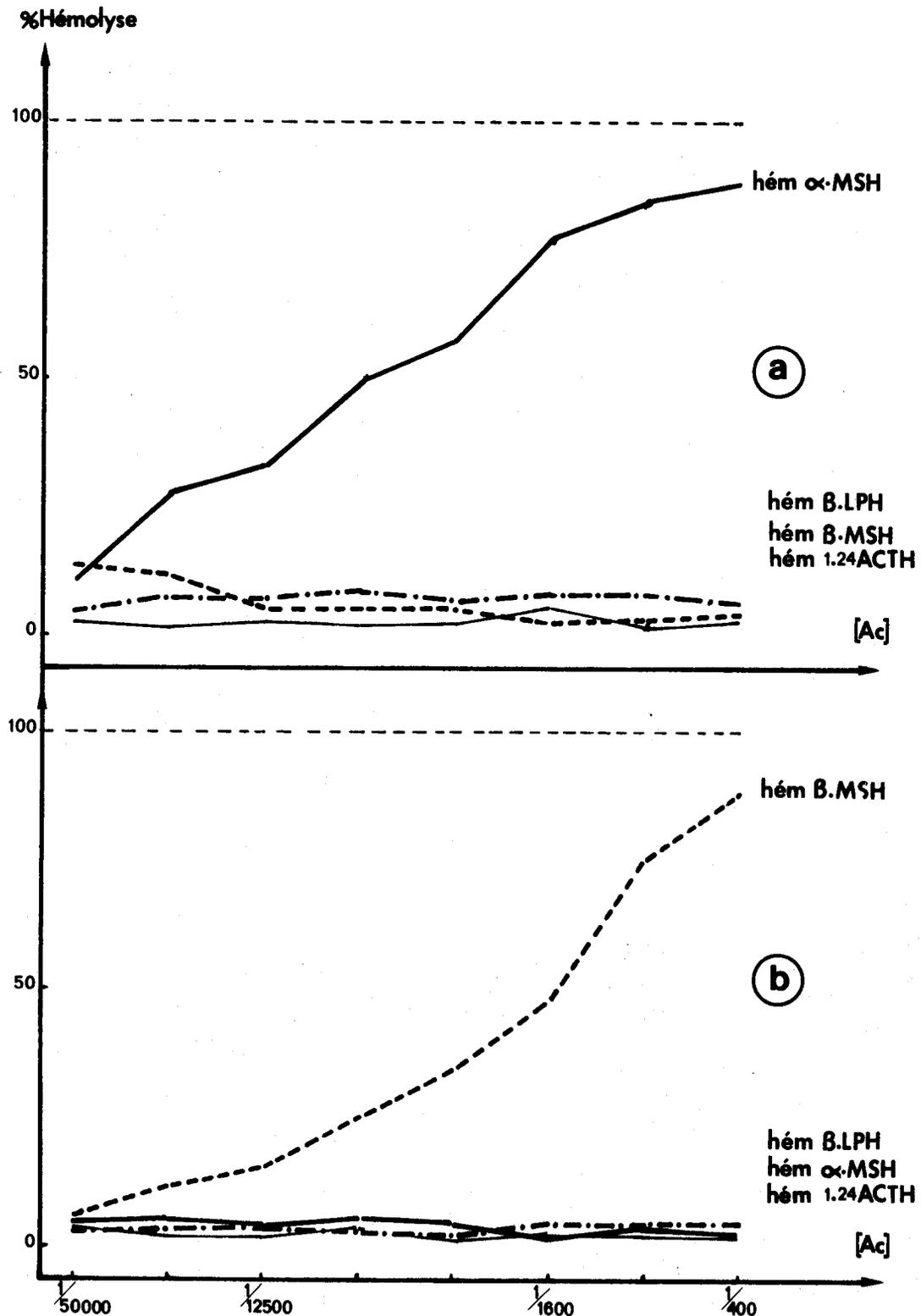


Fig. 6 : Immunohémolyse passive indirecte. Courbes obtenues avec des anti-MSH vis-à-vis d'hématies (hém.) sensibilisées par α -MSH, β -MSH, 1-24ACTH ou β -LPH.

(a) : Ac. anti- α -MSH (84) : ne croise pas avec 1-24ACTH, β -MSH ou β -LPH.

(b) : Ac. anti- β -MSH (6602) : ne croise pas avec 1-24ACTH, α -MSH ou β -LPH.



b) Tests radioimmunologiques

Nos trois sérums anti-enképhaline ont été testés dans un système radioimmunologique par Dominique CROIX.

- Un excès 250 fois molaire de leucine-enképhaline est nécessaire pour inhiber la fixation de méthionine-enképhaline marquée, sur l'anti-méthionine enképhaline (M1).
- L'anti-leucine-enképhaline (L) ne déplace pas la méthionine-enképhaline marquée.

Aucune réaction croisée ne peut être décelée entre sérums anti-leucine ou méthionine-enképhaline d'une part et β -endorphine d'autre part.

De plus, en raison du marquage par les anti-enképhaline des cellules gonadotropes chez le Cobaye (Chapitre 2, III, B, 1°), les réactions des sérums avec quelques gonadotropines ont été étudiées : aucun des trois anti-sérums ne réagit vis-à-vis de LH, FSH ou HCG.

2°) Tests immunohistologiques

La spécificité des immunsérums a également été évaluée par le test d'inhibition de l'immunofluorescence (ou du marquage enzymatique). La réaction, bien qu'uniquement qualitative est d'une grande sensibilité. Elle consiste en une préabsorption de l'immunsérum par l'antigène (ou par une substance susceptible de pouvoir fixer les anticorps du sérum) en concentration croissante. Après cette préabsorption (d'une durée de 12 à 24 heures), les différentes dilutions sont appliquées sur coupes adjacentes, l'une de ces coupes étant traitée avec le sérum témoin non absorbé. La réaction peut être révélée en immunofluorescence ou en immunoperoxydase.

La spécificité de tous les sérums utilisés a été éprouvée de cette façon, en plus des tests déjà pratiqués *in vitro*. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau II.

Immunsérum anti- Ag adsorbant	1-24 ACTH	17-39 ACTH	25-39 ACTH	4-10 ACTH	α -MSH	β -MSH	β -LPH *	γ -LPH *	α -END	β -END	LEU- ENK	MET- ENK
1-39ACTH	-	-	-		+	+	+	+				
1-24ACTH	-	+	+	+	+	+	+	+				
17-39ACTH *	-	-	-		+	+	+	+				
4-10ACTH	+	+	+	-	+	+						
α -MSH	+	+	+	+	-	+	+	+				
β -MSH	+	+			+	-	+	+				
β -LPH 1-91 *	+	+			+	+	-	-	+	-		
γ -LPH 1-58 *	+	+			+	-	-	-	+	+		
α -endorphine									-	+	+	+
β -endorphine									+	-		
Leu-enk									+	+	-	+ - (1)
Met-enk									+	+	+	-

TABEAU II : Réaction immunocytologique après absorption des immunsérums par l'antigène ou par des polypeptides voisins de l'antigène.

(+) indique la présence d'un marquage net ; (-) traduit l'inhibition du marquage.

* Résultats communiqués par le Dr. DUBOIS

(1) les marquages hypophysaires sont atténués ou inhibés alors que les marquages hypothalamiques persistent.



D - METHODES IMMUNOHISTOCHIMIQUES

Dans ce paragraphe, nous exposerons les différentes étapes histologiques permettant d'arriver au marquage sur coupe de l'antigène.

1°) Préparation du tissu

A notre connaissance, c'est MARSHALL qui en 1951 tenta pour la première fois de détecter un antigène sur coupe de tissu ; il s'agissait d'ailleurs de l'ACTH.

L'application d'une technique immunologique sur un tissu préparé pour une étude histologique est une démarche qui, d'un point de vue théorique n'a pas été admise facilement. En effet, la fixation, indispensable à l'obtention d'images satisfaisantes paraissait totalement incompatible avec une conservation de l'antigène qui permette sa reconnaissance par l'anticorps. La fixation, basée sur l'utilisation de traitements chimiques coagulants ne pouvait, pensait-on, que provoquer la dénaturation profonde de l'antigène.

En pratique, il est vite apparu que le temps de fixation du tissu n'empêchait pas la liaison de l'immunoglobuline à des sites cellulaires précis. De plus, tous les tests effectués concluaient à la spécificité du marquage.

Il s'est même avéré que la fixation chimique du tissu était favorable à la détection des antigènes tissulaires. En effet, la réaction pratiquée sur tissu non fixé immédiatement coupé à congélation ne donne que des résultats médiocres, voire nuls.

En fait, la dénaturation de l'antigène est certaine mais elle n'est jamais complète et son degré dépend de la nature du fixateur. S'il dénature vraisemblablement l'antigène, le fixateur modifie également la structure des membranes de l'appareil cellulaire dans lequel est contenue la substance à détecter. L'accès de la grosse molécule d'immunoglobuline pourrait

donc s'en trouver favorisé. Au contraire, des conditions techniques respectant mieux la structure membranaire auraient l'effet opposé : il apparaît donc que la fixation est un temps délicat qui devra résulter en une dénaturation suffisante pour permettre le passage des anticorps, mais aussi ménagée, pour éviter la disparition de l'antigénicité.

Chronologiquement, la fixation est suivie du processus d'inclusion, indispensable à l'exécution des coupes, mais qui peut amener une baisse de l'immunoréactivité tissulaire préjudiciable à une bonne détection morphologique. A cet effet, l'inclusion en paraffine semble devoir être évitée lorsque la quantité d'antigène tissulaire est faible. Par exemple, la détection de la β -endorphine dans l'hypophyse ne paraît pas souffrir de l'inclusion en paraffine alors que le même procédé est manifestement néfaste à la localisation de la β -endorphine hypothalamique.

Dans certains cas, nous avons donc recouru à l'emploi du cryostat afin d'éviter les temps de déshydratation puis d'imprégnation par un solvant organique.

a) Pour coupes à la paraffine

La technique d'inclusion à la paraffine a donné des résultats très satisfaisants dans la détection des hormones polypeptidiques dans l'hypophyse. Les glandes sont disséquées et fixées par immersion dans un mélange fixateur.

1) Choix d'un fixateur

Au cours de notre étude sur la localisation des différentes sécrétions hormonales de l'hypophyse nous avons mis à l'épreuve neuf mélanges fixateurs connus pour donner de bons résultats après inclusion à la paraffine. Le tableau III regroupe les données concernant la qualité des réactions obtenues en fonction de la famille des hormones recherchées.

Les résultats qui y sont exposés concernent l'hypophyse du Cobaye. La composition des neuf mélanges fixateurs cités est consignée dans le manuel de GABE (1968). La lecture du tableau montre que la nature du fixateur retentit parfois très fort sur l'immunoréactivité. L'exemple le plus spectaculaire concerne la révélation immunohistologique de la prolactine qui ne peut se faire chez le Cobaye qu'après fixation par des mélanges contenant de l'alcool éthylique (Carnoy et Bouin alcoolique). Par contre, ces mêmes fixateurs ne donnent aucun résultat dans la détection des hormones glycoprotéiques.

La caractérisation des hormones polypeptidiques paraît moins contingente de la nature du fixateur. En effet, exception faite du Helly avec lequel les réactions sont médiocres, tous les mélanges testés donnent des résultats acceptables. Les meilleurs marquages sont toutefois observés après utilisation de ceux qui contiennent du formol et du sublimé (Bouin-Hollande-Sublimé, Formol-sublimé, fixateur de Stieve).

Hormones Fixateur	Protéiques		Glycoprotéiques LH - FSH - TSH	Polypeptidiques ACTH - MSH - Endorphines
	GH	PRL		
Carnoy	++	++	0	+
Bouin-alcoolique	+ -	+	0	++
Bouin	++	0	++	++
Bouin-Hollande-Sublimé	++	0	++	++
Bouin-Alun de Chrome	+ -	0	+	+
Mélange d'Elftman	+	0	+	+
Formol-Sublimé	++	0	++	+++
Fixateur de Stieve	++	0	++	++
Mélange de Helly	+ -	0	+ -	+ -

TABLEAU III : Réactions immunohistologiques obtenues sur l'hypophyse du Cobaye après utilisation de mélanges fixateurs variés et inclusion en paraffine.

0 : absence de réaction ; + : réaction médiocre ; + à +++ : réaction bonne à excellente.

2 - Durée de la fixation et de l'inclusion

Dans la mesure où l'action prolongée du fixateur est censée dénaturer les antigènes tissulaires, le temps de fixation par immersion est réduit à 36 heures et les temps de déshydratation et d'inclusion sont conduits sur 24 à 36 heures.

3 - Coupes

Des coupes de 2 à 5 μ m sont réalisées et collées sur lame à l'aide d'eau albumineuse.

b) Pour coupes au cryostat

Le cryostat a été utilisé pour la détection des enképhalines dans l'appareil hypothalamo-hypophysaire et pour celle de l'ACTH, MSH et endorphines dans l'hypothalamus.

Pour ces études deux fixateurs ont été employés : le formol à 4 % et le "picric-acid-formaldéhyde" (PAF) de STEFANINI et coll. (1967). Les meilleurs résultats ont dès l'abord été obtenus avec le PAF et c'est donc ce fixateur qui a été utilisé dans les études rapportées ici.

La fixation proprement dite débute par la perfusion du mélange. L'animal est anesthésié au Nembutal (50 mg/kg). Après l'ouverture de la cage thoracique, une incision est faite à la pointe du coeur. Une canule peut alors être mise en place jusque dans l'aorte. La durée de la perfusion est d'environ 15 minutes pendant lesquelles 300 ml de fixateur sont utilisés.

Après dissection, l'appareil hypothalamo-hypophysaire est immergé dans le fixateur pendant une heure. Après quoi la pièce est plongée, 12 heures, dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 contenant 5 p. 100 de saccharose, puis enrobée dans du Tissue-Tek (Miles Laboratories, Naperville, Illinois). L'enrobage se fait dans une petite boîte réalisée par pliage d'une feuille

d'aluminium Albal. L'ensemble est alors plongé dans le propane liquide (ou dans le méthyl-2-butane) refroidi par l'azote liquide. Le bloc est démoulé, fixé sur la platine porte-objet du cryostat, de façon à effectuer des coupes dans le plan sagittal ou frontal. Des sections de 5 à 10 μm d'épaisseur sont confectionnées et collées sur des lames traitées à la gélatine-alun de chrome (1)*.

(1)* : Obtention des lames gélatinées

Les lames soigneusement nettoyées et placées en paniers à coloration, sont plongées dans l'eau puis égouttées sans être séchées. Les paniers sont immergés quelques secondes dans une solution préparée à environ 60°C contenant pour 100 ml d'eau, 0,05 g d'alun de chrome et 0,5 g de gélatine. Les lames égouttées et séchées à l'étuve peuvent être conservées à - 20°C.

c) Pour coupes semi-fines

La réaction anti-1-24ACTH sur coupes semi-fines d'hypophyse de Lérot, a été réalisée sur tissu fixé par immersion pendant 3 heures dans le mélange à 4 % de glutaraldéhyde et 2 % de formaldéhyde dans le tampon cacodylate 0,08 M final (2)** , puis post fixé 2 heures dans une solution à 1 % de tétroxyde d'osmium dans le tampon cacodylate 0,1 M. Le tissu est inclus dans l'araldite selon la méthode de RICHARDSON et coll. (1960).

- (2)** : Pour 25 ml de solution de fixateur :
- 10 ml de cacodylate de Na, 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_2 à 5 p. 100.

d) Pour coupes ultra-fines

La localisation ultrastructurale des enképhalines dans l'éminence médiane et l'hypophyse (Chapitre 2, III et Chapitre 3, II) a été réalisée sur tissu fixé au PAF selon les modalités exposées au b) de ce paragraphe. La réaction immunohistologique a été effectuée sur tranches de tissu, avant l'enrobage dans l'araldite ou après cet enrobage, sur coupes ultra-fines (voir même chapitre : D, 2°, d)).

2°) Réactions immunohistochimiques utilisées seules

Nous ne mentionnerons que pour mémoire, la réaction directe pratiquée après marquage de l'immunoglobuline spécifique elle-même par l'isothiocyanate de fluorescéine. La figure 7 schématise cette réaction.

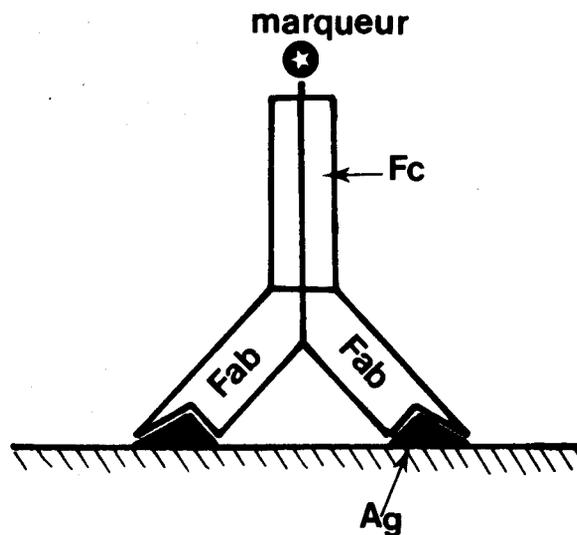


Fig. 7 : Réaction directe en immunohistochimie.

L'immunoglobuline spécifique est schématisée et ses trois fragments (Fc et 2 Fab) représentés.

Ag : antigène tissulaire.

La même représentation schématique sera utilisée dans les figures 8, 9, 10 et 11.

Généralement, c'est une réaction de type indirect qui est préférée parce que présentant plusieurs avantages. En premier lieu, le marqueur n'est pas couplé à l'immunoglobuline spécifique ce qui évite la dénaturation plus ou moins importante de cette dernière. En outre, lorsque plusieurs immunsérums différents sont utilisés, cette façon de procéder ne nécessite qu'un sérum de marquage. D'autant que les sérums marqués à la fluorescéine ou à la peroxydase sont disponibles dans le commerce. Enfin, l'emploi d'une deuxième immunoglobuline résulte en une augmentation du nombre des unités de marqueur par site antigénique, donc en une amélioration de la réaction sur coupe.

La comparaison des représentations schématiques proposées par les figures 7 et 8 montre comment, par la méthode indirecte, un site antigénique pourrait fixer quatre fois plus de marqueur que par la méthode directe.

Nous exposerons donc en détail la méthode indirecte et d'autres qui en découlent et que nous avons largement utilisées dans ce travail.

a) Méthode indirecte (Fig. 8 et 9)

Elle se déroule en deux temps : l'immunsérum spécifique de l'antigène recherché a été produit dans une espèce donnée, ici, le Lapin. Le sérum utilisé comme révélateur sera donc produit par immunisation d'un animal d'une autre espèce (généralement le Mouton) contre les immunoglobulines de Lapin. C'est ce deuxième sérum qui sera couplé au marqueur (fluorescéine ou peroxydase).

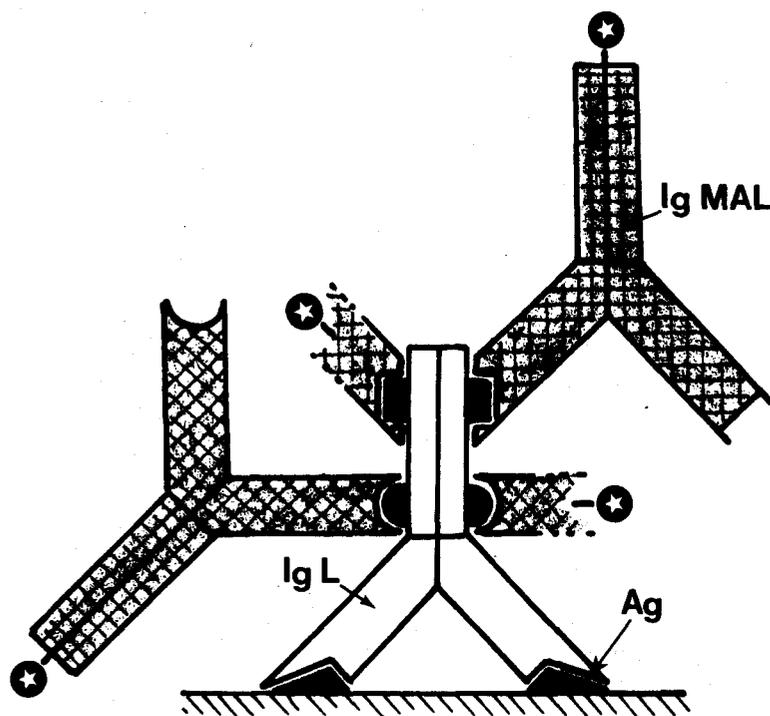


Fig. 8 : Réaction immunohistochimique indirecte.

Ig.L : immunoglobuline de Lapin, spécifique de l'antigène tissulaire (Ag)

Ig.MAL : immunoglobuline marquée de Mouton anti-immunoglobuline de Lapin.

1 - Application du sérum spécifique

L'anticorps est appliqué à la dilution convenable pendant un laps de temps qui dépend du titre de l'immunsérum, de la dilution utilisée et de la température de réaction. Pour les immunsérums employés dans ce travail, le temps d'incubation est compris entre 30 minutes et 1 heure, lorsque la dilution est comprise entre 1/20 et 1/100, à la température du laboratoire. La dilution de l'immunsérum est faite dans le tampon de Coons pH 7,2 additionné volume à volume d'eau distillée(1), et contenant 0,1 p. 100 de l'albumine (BSA, HSA ou ovalbumine) utilisée comme protéine porteuse du peptide antigène lors de l'immunisation du lapin producteur des anticorps.

(1) : *Tampon de Coons dilué :*

- 5 litres d'eau distillée
- Véronal sodique 20,6 g
- NaCl 85 g
- HCl normal 80,6 ml

La solution est diluée de moitié au moment de l'emploi.

Nous avons également procédé à des incubations longues à forte dilution et température basse : 24 à 48 h, 1/1000 à 1/5000 à 4°C. Les incubations longues doivent être pratiquées en chambre humide pour éviter l'évaporation.

Lorsque l'on veut comparer des réactions entre elles, des coupes adjacentes convenablement essorées sont recouvertes une à une par les dilutions d'immunsérums différents.

2 - Application du sérum marqué

Elle se fait généralement en incubation courte (30 mn pour une dilution au 1/40, à 20°C) mais aussi en incubation longue (24 heures pour une dilution de 1/1000 à 4°C).

Des sérums marqués de deux façons différentes et provenant de l'Institut Pasteur, ont été employés :

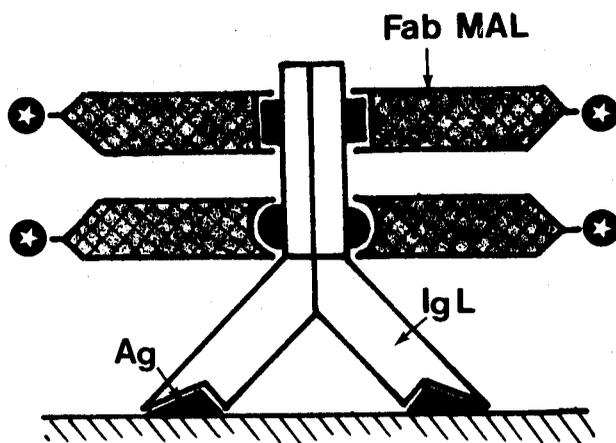


Fig. 9 : Réaction immunohistochimique indirecte utilisant la fraction Fab marquée à la peroxydase.

Ig.L : immunoglobuline de Lapin, spécifique de l'antigène tissulaire (Ag).

Fab.MAL : fraction Fab marquée de Mouton anti-immunoglobuline de Lapin.

Cette solution est appliquée sur les coupes pendant une minute environ.

L'apparition du précipité brun est contrôlée au microscope et la révélation est arrêtée par immersion dans l'eau distillée. Il est possible de déshydrater la lame et de monter une lamelle au baume ou à une résine synthétique.

Avant déshydratation, la révélation de l'antigène peut être complétée par une coloration telle que le tétrachrome de Herlant qui donne de bons résultats, même après la réaction immunohistochimique.

- Utilisation du chloronaphtol (NAKANE, 1968)

40 mg de 4-chloro-1-naphtol sont dissous dans 2 ml d'éthanol absolu. 100 ml de tampon TRIS 0,1 M, pH 7,6 sont ajoutés et le précipité floconneux qui se forme est éliminé par filtration. Le filtrat est utilisé après addition de 250 μ l d' H_2O_2 à 110 volumes (ou 30 %) soit une concentration finale en H_2O_2 de 0,075 p. 100. Un précipité bleu-violet souvent très foncé apparaît en quelques minutes. La lame ne peut être montée au baume, car le précipité est extrêmement soluble dans le toluène et le benzène. L'examen se fait donc après montage d'une lamelle à la glycérine.

α) Sérum marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine
.....

Après incubation par l'anticorps spécifique et rinçage, les coupes sont recouvertes d'une dilution du conjugué fluorescent dans le tampon de Coons dilué de moitié. Elles sont ensuite rincées dans le même tampon et montées à la glycérine. Le montage à la glycérine de la lamelle peut être précédé d'une contre-coloration des coupes au bleu Evans en solution à 1/10000 dans le tampon de Coons (temps de coloration : 15 mn). Les lames sont examinées au microscope équipé en fluorescence par réflexion.

β) Sérum marqué à la peroxydase de Raifort
.....

L'Institut Pasteur commercialise deux conjugués Mouton-anti-Lapin marqués à la peroxydase. Le premier obtenu par couplage de la peroxydase sur les immunoglobulines entières, alors que pour le second seule la fraction Fab est utilisée. Selon notre expérience, les deux conjugués donnent un marquage très franc. Cependant, avec le second, la coloration parasite de fond est moins importante, si bien que c'est essentiellement le conjugué Fab que nous avons utilisé (voir schéma de la réaction Fig. 9).

Le conjugué marqué est appliqué sur coupe selon les modalités déjà exposées pour le conjugué fluorescent : incubation courte (30 mn, 1/40, 20°C, incubation longue (24 h, 1/1000, 4°C).

Les coupes sont ensuite rincées et la peroxydase est révélée par une réaction enzymatique colorée. Deux substrats ont été utilisés : soit la diaminobenzidine tétra-HCl, soit le 4-Chloro-1-naphtol.

- Utilisation de la diaminobenzidine (DAB) selon la technique de GRAHAM et KARNOVSKY (1966).

50mg de DAB sont dissous dans 100 ml de tampon TRIS 0,1 M, pH 7,6 (1) et additionnés de 0,003 p. 100 d'H₂O₂.

- (1) : Composition du tampon TRIS 0,1 M, pH 7,6
TRIS (hydroxyméthyl) aminométhane 12 g
HCl normal 83 ml
1 litre d'eau distillée

3 - Cas particulier de la méthode indirecte sur coupes semi-fines

Les coupes semi-fines, d'une épaisseur de 1 à 1,5 μm , sont débarrassées de l'araldite selon la méthode de MAYOR et coll. (1961) au méthoxyde de sodium dilué au tiers, pendant 3 mn. Après passage dans un mélange volume à volume de méthanol-benzène, puis dans l'acétone, elles sont rincées dans l'eau.

Après quoi, une oxydation à l'eau oxygénée à 10 p. 100 leur est appliquée pendant 10 mn. Ce temps est indispensable à l'obtention du marquage immunohistochimique. Il semble donc que l'"oxydation" soit capable de supprimer un certain masquage des sites antigéniques, provoqué par les traitements de fixation (glutaraldéhyde-formol-tétroxyde d'osmium) et peut-être d'inclusion.

Le séjour prolongé (12 h) des lames dans le tampon (Coons pH 7,2 ou phosphate pH 7,2) est favorable à la réaction indirecte qui suit et dont le déroulement ne diffère pas de celui de la technique sur coupes à la paraffine.

La mise au point de la réaction immunohistochimique sur coupe de tissu inclus dans l'araldite, a permis de connaître l'ultrastructure d'une cellule reconnue par l'immunologie, en évitant les inconvénients de la détection immunocytoologique sur coupe ultra-fine. Ces inconvénients résultent de l'emploi d'une fixation peu compatible avec l'obtention d'images précises (voir BEAUVILLAIN, 1978). La méthode de superposition d'images de microscopie photonique et électronique que nous avons élaborée et appliquée en collaboration avec J.C. BEAUVILLAIN a donné d'intéressants résultats chez le Lérot et le Cobaye (BEAUVILLAIN et coll. 1974 et 1975 ; TRAMU et coll., 1974 a et b). Un exemple concernant les cellules corticotropes du Lérot, fait l'objet de la planche IV.

4 - Remarques concernant l'utilisation de la méthode indirecte

α) Avantages respectifs de la révélation par la fluorescéine
.....
ou par la peroxydase
.....

Par sa précision, sa rapidité d'exécution et sa reproductibilité, l'immunofluorescence est incontestablement une méthode de choix parmi les techniques immunohistochimiques existant actuellement. Cependant, elle nécessite un microscope spécial et, quand on veut procéder à des comparaisons son emploi n'est pas commode. Au contraire, l'immunoperoxydase rend plus aisés l'examen des coupes et l'exécution des microphotographies, du fait de l'utilisation d'un photomicroscope classique.

En outre, cette technique permet après révélation par la DAB, de disposer de préparations permanentes. Un peu plus loin dans ce paragraphe (3°) nous verrons que la méthode à la peroxydase est particulièrement utile dans la mise en évidence simultanée de deux antigènes.

β) Utilisation des fortes dilutions
.....

Nous n'avons pas trouvé d'avantage particulier à l'utilisation des immunosérums en fortes dilutions, en dehors bien entendu de l'aspect économique de la question, aspect qui souvent n'est pas négligeable.

b) Méthode dite "du pont" (Fig. 10)

Cette méthode a le pouvoir de renforcer une réaction qui serait trop faible. La figure 10 montre comment ce but est atteint.

1 - Principe et intérêt

En augmentant les intermédiaires entre l'immunoglobuline spécifique et le marqueur, on intensifie le marquage donc la visualisation des sites antigéniques. L'exemple proposé dans la figure 10 montre comment une molécule d'immunoglobuline spécifique pourrait être susceptible de fixer 12 molécules d'immunoglobulines marquées.

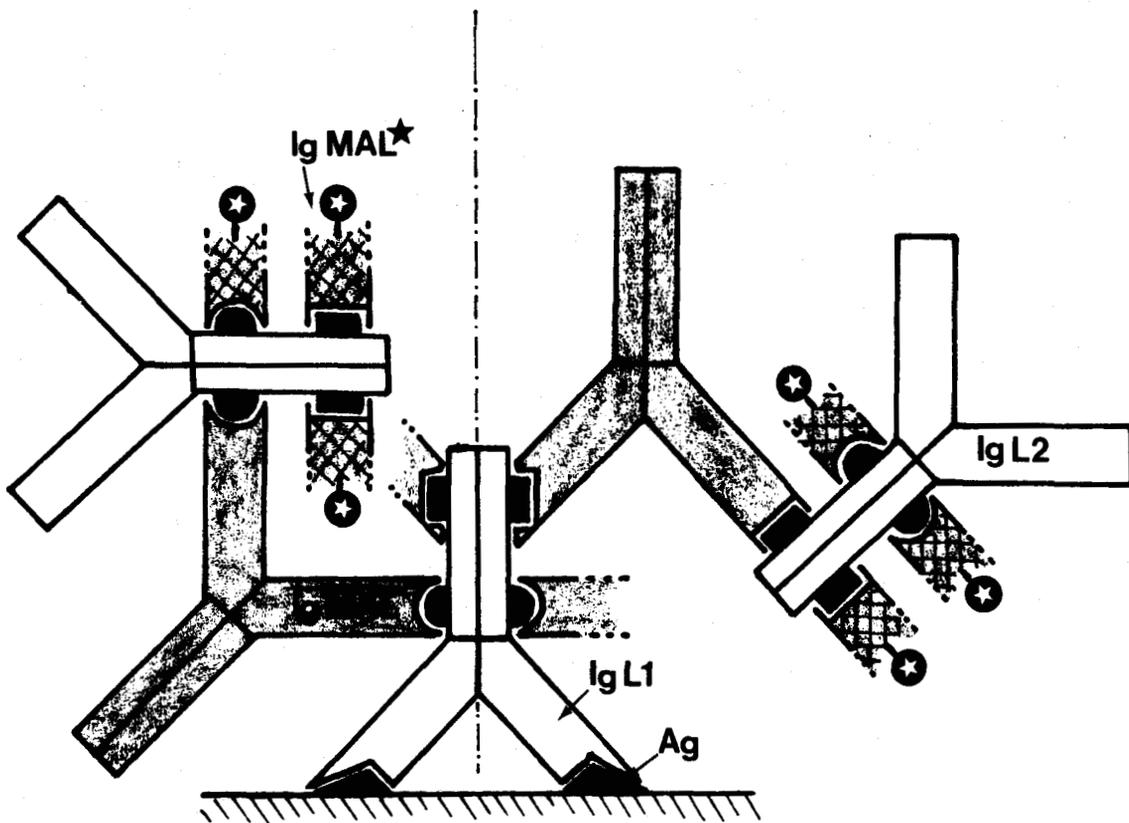


Fig. 10 : Méthode immunohistochimique du "pont".

Ig.L1 : immunoglobuline de Lapin, spécifique de l'antigène (Ag)

Ig.L2 : immunoglobuline de Lapin non immunisé

Ig.MAL : immunoglobuline de Mouton, anti-Ig Lapin

Ig.MAL* : immunoglobuline de Mouton, anti-Ig Lapin, marquée.

2 - Mode opératoire

Il découle de celui de la méthode indirecte :

1er temps : Application de l'anticorps spécifique.

2ème temps : Application d'un sérum de Mouton anti-immunoglobulines de Lapin. Ce sérum sera utilisé à faible dilution (1/20) de façon à ce qu'un maximum de déterminants anti-Lapin demeurent disponibles pour le temps suivant.

3ème temps : Application d'un sérum de Lapin non immun, à faible dilution également (1/20).

4ème temps : Application du sérum de Mouton anti-Lapin marqué.

A 20°C, la durée de chaque temps est d'environ 30 mn.

c) Méthode du PAP (Fig. 11)

1 - Principe et intérêt

L'originalité de la méthode réside dans le fait qu'elle utilise comme marqueur, non pas une immunoglobuline couplée à la peroxydase mais le complexe peroxydase-anti-peroxydase (PAP) (STERNBERGER et coll., 1970) préalablement solubilisé. C'est la "méthode à l'anticorps non marqué " des Anglo-Saxons.

Le complexe PAP est réalisé en saturant un sérum de Lapin anti-peroxydase par la peroxydase. Pour que ce complexe marque le site antigénique il suffit d'intercaler entre lui et l'anticorps spécifique (produit par un Lapin), une immunoglobuline anti-Ig Lapin (produite par un Mouton ou une Chèvre).

La méthode a l'intérêt d'éviter l'emploi en tant que marqueur, d'une immunoglobuline qui aurait été chimiquement couplée à la peroxydase, donc dont les sites anticorps auraient pu être partiellement dénaturés.

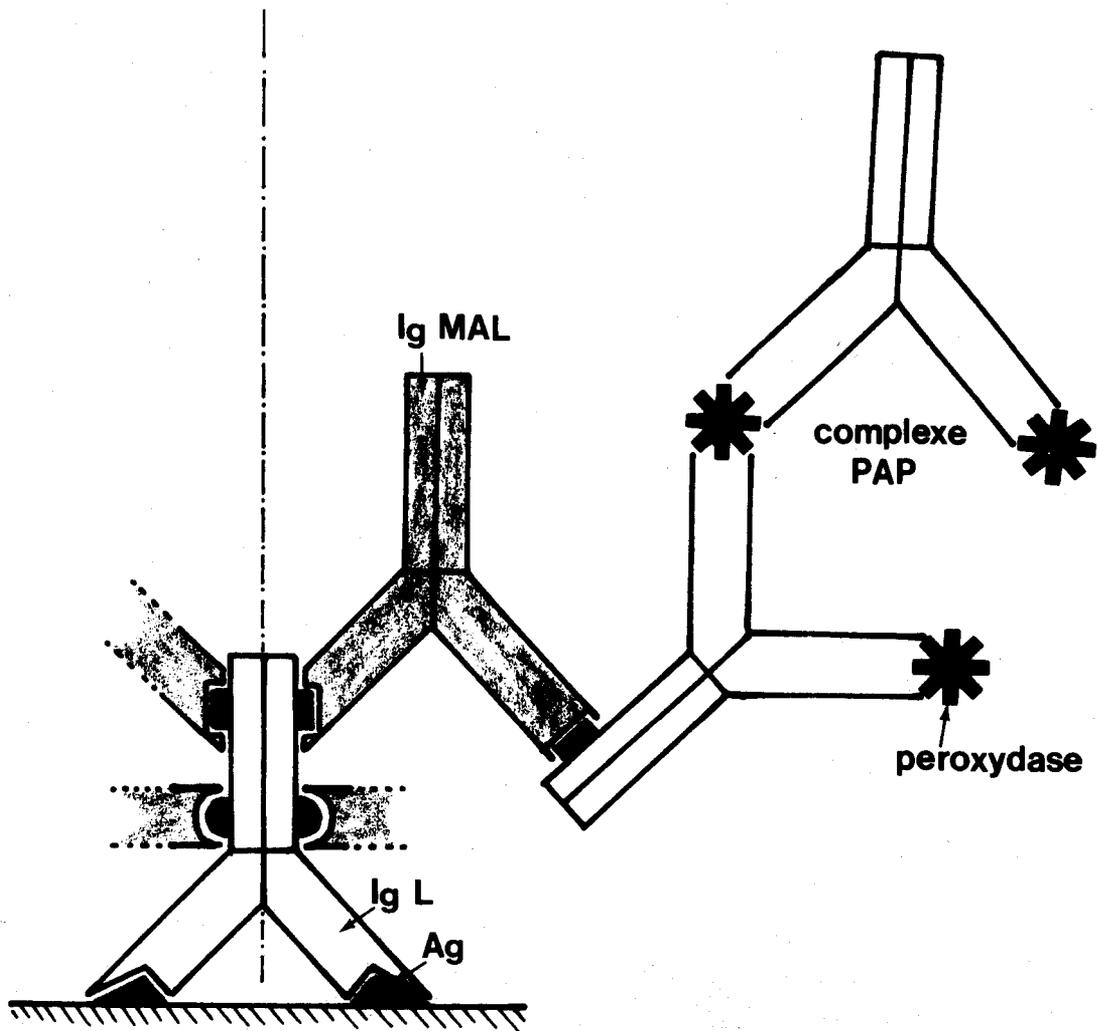


Fig. 11 : Méthode du PAP.

Ig.L : immunoglobuline de Lapin, spécifique de l'antigène (Ag)

Ig.MAL : immunoglobuline de Mouton anti-Ig Lapin.

2 - Utilisation du PAP en microscopie photonique

α) Mode opératoire

Les deux premiers temps de la technique sont identiques à ceux de la méthode du "pont".

Le 3ème temps consiste en l'application d'une dilution du complexe PAP. Le temps d'incubation est d'environ 15 mn, mais la dilution du complexe varie considérablement suivant son origine. Pour donner des résultats acceptables, certains lots que l'on se procure dans le commerce doivent être utilisés au 1/30, alors que le complexe PAP produit par le laboratoire de Mr DUBOIS fournit d'excellentes réactions après dilution au 1/200.

La révélation de la peroxydase se fait comme précédemment soit à la DAB, soit au chloronaphtol.

REMARQUE : Il existe une autre méthode immunohistochimique proche du PAP mais qui n'utilise pas le complexe soluble préparé au préalable. Après les deux premiers temps, un immunsérum de Lapin anti-peroxydase est appliqué. La peroxydase est amenée dans un temps suivant par une dilution déposée sur les coupes. Nous n'avons personnellement pas utilisé cette méthode, dont un travail tout récent (BERGROTH et coll., 1980) rapporte les qualités.

β) Comparaison des résultats avec ceux de la méthode indirecte

En ce qui concerne son exécution, la technique au PAP ne présente pas de difficulté supplémentaire bien qu'elle comporte un temps de plus que la méthode indirecte.

Les résultats sont meilleurs que ceux de la méthode indirecte lorsque celle-ci utilise les immunoglobulines totales marquées à la peroxydase. Cependant, à notre avis, la qualité des marquages fournis par le sérum Fab Mouton-anti-Lapin marqué est au moins équivalente à celle des réactions au PAP. D'autant plus que, selon notre expérience, le "bruit de fond" a toujours été plus élevé avec le PAP qu'avec le Fab. Or, la lisibilité des résultats dépend du contraste entre structures marquées et fond de la préparation. Même fort, un marquage peut être moins intéressant s'il apparaît sur un important bruit de fond.

Néanmoins nous devons préciser que nous n'avons pas systématiquement utilisé la technique du PAP sur notre matériel, la méthode indirecte nous ayant donné des résultats de bonne qualité sur l'hypophyse tout particulièrement. Sur l'hypothalamus, le PAP a été employé au cours de réactions successives sur une même coupe (voir chapitre 3). Ces réactions sont longues et imposent l'utilisation de traitements chimiques peu compatibles avec une bonne adhérence de la coupe sur la lame. Nous avons donc choisi de ne pas allonger les temps d'incubation de sorte que les sérums ont été utilisés à faible dilution. Il est possible qu'employées en incubation longue, de plus fortes dilutions (de l'ordre du 1/1000) aient pu donner moins de réaction de fond.

3 - Utilisation du PAP en microscopie électronique

α) Mode opératoire

Lors de la détection ultrastructurale des enképhalines, cette méthode a été effectuée sur coupes ultra-fines recueillies sur grilles, de tissu fixé par perfusion au PAF et inclus dans dans l'araldite.

La technique utilisée est celle de PETRALI et coll.

(1974) :

- 20 mn d' H_2O_2 à 10 p. 100. Rinçage.
- Sérum de mouton non immun au 1/30, 5 mn. Rinçage.
- Immunsérum spécifique du peptide à une dilution de 1/300 pendant 12 h à 4°C.
- Rinçage dans le tampon contenant 1/100 de sérum de mouton non immun.
- Sérum de mouton anti-Ig Lapin au 1/30. 5 mn. Rinçage au tampon.
- Complexe peroxydase-anti-peroxydase dilué au 1/50, 5 mn.
- Rinçage au tampon TRIS salin.
- Révélation de la peroxydase, 3 mn, sous agitation, par solution de 12,5 mg de DAB dans 100 ml de tampon TRIS non salin additionné de 0,1 ml d' H_2O_2 à 3 p. 100.
- Rinçage soigneux dans l'eau.
- Tétroxyde d'osmium à 4 p. 100 : 10 à 20 mn.

Deux solutions tampon sont employées au cours de cette méthode :

Les dilutions de tous les sérums ont été faites dans le tampon phosphate salin (1) pH 7,2, à l'exception de celle du complexe PAP effectuées dans le TRIS salin 0,1M, pH 7,6.

(1) : *Composition du tampon phosphate salin pH 7,2*

- . 1 litre d'eau distillée
- . Na_2HPO_4 anhydre 1,07 g
- . NaH_2PO_4 ; 2 H_2O 0,39 g
- . NaCl 8,5 g

β) Avantages
.....

La méthode est considérée comme beaucoup plus sensible que celle qui met en jeu une révélation par des immunoglobulines marquées (PETRALI et coll., 1974). De plus, grâce au pouvoir séparateur important du microscope électronique, il est possible de visualiser les agrégats composés par la peroxydase et deux immunoglobulines (complexe PAP représenté fig. 11). Cet aspect typique est généralement admis comme gage de spécificité pour une réaction.

d) Méthodologies appliquées dans le but d'un examen en microscopie électronique

La détection immunologique du peptide se fait, soit avant le temps d'enrobage dans l'araldite, soit après, sur coupes ultrafines.

1 - Méthode avant enrobage

α) Principe
.....

La réaction antigène-anticorps se fait avant les traitements chimiques de déshydratation et d'inclusion. L'antigénicité des substances recherchées est donc théoriquement mieux préservée.

β) Mode opératoire
.....

La réaction consiste en l'incubation de sections de tissu préparé comme cela a été décrit précédemment, pour la technique au cryostat en microscopie photonique (D, 1°, b)). Les sections sont effectuées à la lame de rasoir. Leur épaisseur approximative varie de 0,1 à 0,5 mm.

Nous avons également appliqué cette technique sur des coupes de 20 µm d'épaisseur, confectionnées au cryostat.

Quel que soit leur mode d'obtention, les sections sont successivement passées dans les différents milieux d'incubation, jusqu'à révélation de la peroxydase :

- Sérum de mouton non-immun au 1/100, 1 heure.
- Immunsérum spécifique du peptide au 1/300, 12 h, 4°C.
- Rinçage soigneux en changeant 3 fois de bain.
- Fab Mouton anti-Ig Lapin marqué à la peroxydase 1/80, 2 h.
- Rinçage soigneux.
- Révélation de la peroxydase par la DAB, tampon TRIS.
- Rinçage soigneux à l'eau distillée.
- Tétroxyde d'osmium à 4 p. 100, 20 mn.
- Déshydratation ; enrobage dans l'araldite.

Les sérums sont dilués dans le tampon de Coons pH 7,2.

γ) Avantages et inconvénients
.....

Comme nous l'avons dit, la méthode permet une meilleure préservation des antigènes tissulaires. De plus, grâce à un bon contraste, des organites cellulaires autres que ceux qui réagissent sont très souvent reconnaissables, ce qui est moins fréquent avec la méthode au PAP après enrobage.

La localisation ultrastructurale des enképhalines dans l'éminence médiane (Chapitre 3, II, B, 2°) a été facilitée par l'emploi de la technique avant enrobage. Cette dernière permet non seulement de visualiser les terminaisons immunoréactives, mais encore de préciser leur situation péricapillaire grâce à un bon contraste de l'ensemble des structures.

Les inconvénients sont, d'une part, la conservation médiocre des organites avec en particulier des éclatements granulaires qui peuvent être la cause d'artéfacts et donc d'interprétations erronées. D'autre part, en raison de la pénétration incomplète des immunoglobulines dans l'épaisseur de la coupe, les sites de marquages sont relativement rares. Le choix du marqueur s'est d'ailleurs porté sur le Fab en raison de sa petite taille, logiquement plus favorable pour accéder au site.

2 - Méthode après enrobage

α) Principe

.....

La réaction immunologique se fait sur coupes ultra-fines posées sur grille.

β) Mode opératoire

.....

Exposé précédemment (D, 2°, a, 3 -).

γ) Avantages et inconvénients

.....

La conservation du tissu donc des granules de sécrétion contenant le peptide, est meilleure. D'autre part, la méthode bénéficie de la sensibilité du PAP et de la bonne accessibilité des sites antigéniques, due à la faible épaisseur des coupes. Cependant, les structures autres que celles qui réagissent sont peu contrastées et leur reconnaissance n'est pas aisée. Ceci est tout particulièrement vrai en ce qui concerne le tissu nerveux. Pour l'hypophyse, ce défaut est moins sensible.

e) Contrôle de la spécificité des marquages

Au C, 2° de ce chapitre, nous avons exposé les tests histologiques réalisés pour s'assurer de la spécificité immunologique des réactions. En outre, dans le but d'éviter les marquages parasites dus à des adsorptions mécaniques ou chimiques des immunoglobulines, certaines précautions ont été prises.

Les coupes sont incubées avant la réaction dans la solution tampon additionnée de sérum de Mouton non-immun (1/100 pendant 10 mn). Pour la microscopie électronique, la concentration en sérum est portée à 1/30. D'autre part, des contrôles sont effectués sur quelques coupes choisies parmi celles qui subissent les temps de réaction.

Sur certaines coupes, la dilution d'immunsérum spécifique est remplacée par le seul tampon de dilution ou par une dilution de sérum de Lapin non-immun. Lorsque l'on peut disposer du sérum pré-immun (c'est-à-dire de sérum prélevé sur le lapin producteur de l'immunsérum, avant le début du processus d'immunisation), il est très intéressant de l'utiliser également comme témoin.

Sur d'autres coupes, la dilution de sérum marqué est remplacée par le tampon, si bien qu'il est possible d'apprécier l'importance des réactions dues à une peroxydase endogène ou à une éventuelle pseudoperoxydase.

3°) Réactions immunohistologiques en utilisation combinée ou successive

Les résultats d'une grande partie de ce travail sont dus à la mise au point et à l'utilisation d'une méthode qui permet d'effectuer deux réactions immunohistochimiques, sur une même coupe, chacune d'entre elles étant dirigée contre un antigène donné. Avec cette façon de procéder, il est possible de réaliser des comparaisons d'une très bonne précision, indispensables quand il s'agit de fibres nerveuses.

C'est d'ailleurs dans le but de déterminer la nature des terminaisons qui, dans l'éminence médiane réagissaient aux anti-17-39ACTH que nous avons été amené à pratiquer deux réactions différentes sur une même coupe. Faire disparaître le précipité coloré révélant la première réaction déjà effectuée sur la coupe, ne posait pas de problème majeur. En effet, en utilisant le 4-chloro-1-naphtol comme chromagène, il était possible d'éliminer le marquage bleu-violacé par passage dans le toluène ou l'acétone. Le temps suivant était par contre critique, car devant impérativement se traduire par l'élimination complète des immunoglobulines fixées sur l'antigène au cours de la première réaction.

Deux techniques d'élution des anticorps avaient déjà été proposées par des auteurs différents. Elles étaient pratiquées lors de l'exécution de marquages simultanés de deux ou trois antigènes sur une même coupe, chaque réaction étant révélée par un précipité de couleur différente. Ces techniques consistent en un traitement des coupes par un tampon fortement ionique à bas pH (NAKANE, 1968) ou par un solvant tel que la diméthylformamide (VANDESANDE et DIERICKX, 1975). Entre nos mains, l'efficacité des deux méthodes ne fut jamais que très partielle. Tous nos tests, même ceux qui furent pratiqués en doublant les concentrations préconisées, prouvèrent l'inaptitude des traitements à éluer les anticorps. Les auteurs de la deuxième méthode arrivèrent à une conclusion analogue et proposèrent pour éliminer les immunoglobulines, l'utilisation d'une électrophorèse à bas pH en présence de diméthylformamide (VANDESANDE et DIERICKX, 1976). Nous n'avons pas testé cette façon de procéder, mais nous avons tenté de trouver un traitement chimique simple, susceptible d'éliminer les anticorps donc de rompre la liaison antigène-anticorps. Cette rupture nécessitant un pH acide, nous avons éprouvé l'action d'oxydants acides déjà utilisés en histochimie et connus pour leur capacité à rompre certaines liaisons chimiques.

Le traitement à l'acide periodique à la concentration utilisée au cours de la réaction au PAS (ou même à une concentration double de celle-ci), n'élimine pas les immunoglobulines. Par contre, le traitement au permanganate-sulfurique employé dans la mise en évidence du produit de sécrétion Gomori-positif et supposé rompre les ponts disulfures, est très efficace à la concentration couramment utilisée en histochimie. De plus, les réactions immunohistochimiques pratiquées après ce traitement, sont de bonne qualité. Cependant, dans le but de ménager, autant que possible, les antigènes tissulaires, nous avons recherché la concentration minimum efficace et procédé aux contrôles nécessaires.

a) Nécessité de l'élution

La figure 12 montre les différents temps de la double réaction et le comportement possible des immunoglobulines en l'absence d'élution.

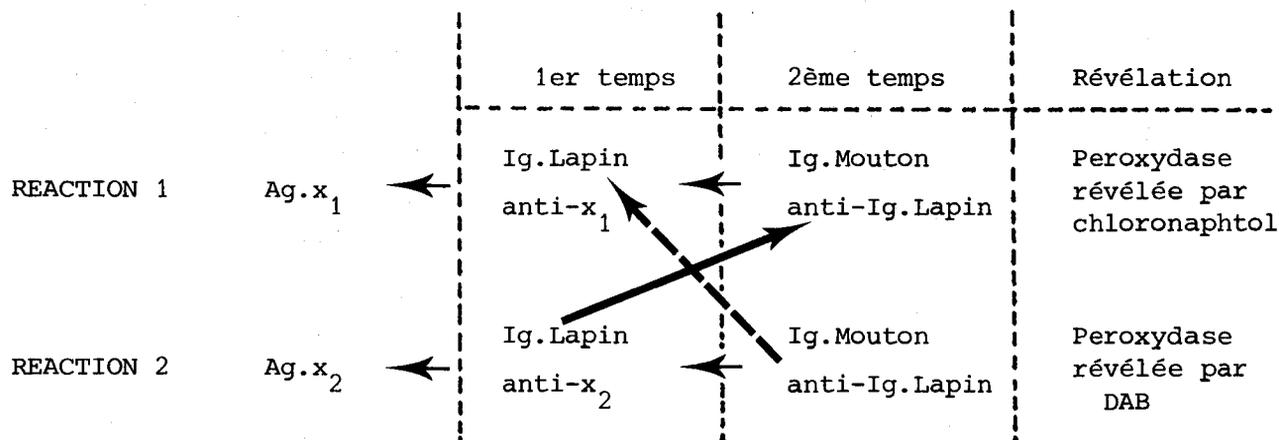


Fig. 12 : Comportement des immunoglobulines en cas de double réaction sans élution.

La flèche pleine indique la liaison qui représente la principale source d'erreur. La flèche en pointillé indique une liaison moins probable.

Au cours de la deuxième réaction, l'anticorps spécifique utilisé dans le 1er temps se fixera sûrement sur les déterminants anti-Lapin du marqueur employé dans la première réaction. Cette fixation parasite s'observe très bien sur coupes car, dans le cas pris comme exemple fig. 12, le marquage de l'antigène x₁ est renforcé par la deuxième réaction ; l'ensemble réalise la méthode dite du "pont" (voir Pl. I, C1 et C2) et le précipité coloré se situe entre le bleu et le brun. En outre, l'immunoglobuline de Mouton anti-Ig.Lapin appliquée au 2ème temps de la 2ème réaction risque de se fixer sur l'immunoglobuline spécifique utilisée au 1er temps de la 1ère réaction, si tous les déterminants antigéniques Lapin de celle-ci n'ont pas été occupés par l'immunoglobuline marquée (2ème temps de la 1ère réaction). On voit donc que la probabilité de cette deuxième fixation parasite est plus faible.

Quoi qu'il en soit, il est impératif d'éliminer les deux immunoglobulines fixées au cours de la première réaction, si l'on veut obtenir une réaction spécifique du deuxième antigène.

b) Elution et contrôle d'efficacité

L'éluion pratiquée à l'aide du mélange permanganate-sulfurique a été testée sur du matériel hypophysaire. Des coupes adjacentes ont été traitées, l'une en vue de la révélation de LH, l'autre pour celle d'ACTH (Pl. I, A1 et A2). Les résultats prouvent incontestablement l'efficacité du traitement dans le sens d'une totale élimination des immunoglobulines et, d'autre part, ils montrent que l'oxydation du tissu par le mélange $\text{KMnO}_4 - \text{H}_2\text{SO}_4$ ne nuit pas à l'immunoréactivité des antigènes tissulaires. La technique est exposée plus loin mais nous préciserons dès maintenant que le mélange employé a été volontairement dilué par rapport à celui qu'utilisent les méthodes histochimiques de Gomori (1 volume de KMnO_4 à 2,5 p. 100, 1 volume d' H_2SO_4 à 5 p. 100 et 10 volumes d'eau). Nos essais d'éluion ont été effectués à l'aide de mélanges qui, pour 1 volume de KMnO_4 et 1 volume d' H_2SO_4 , comprenaient de 10 à 260 volumes d'eau. Selon notre expérience, sur tissu hypophysaire avec les immunosérums utilisés (anti-LH β et anti-17-39ACTH) l'élimination des anticorps commence à devenir incomplète lorsque le mélange éluant contient 200 volumes d'eau. Il est à remarquer que les anti-LH β semblent avoir plus d'affinité pour leurs sites antigéniques que les anti-17-39ACTH n'en ont pour les leurs. En effet, si des anticorps anti-LH β (utilisés au 1/40, 30 mn) commencent à persister avec des mélanges contenant 200 volumes d'eau, les anti-17-39ACTH (utilisés au 1/40, 30 mn) commencent à ne plus être complètement éliminés lorsque le mélange contient 240 volumes d'eau. Il semble donc que l'éluion plus ou moins aisée d'une immunoglobuline, dépende de son "affinité" pour l'antigène, ce qui pourrait expliquer que les techniques d'éluion de NAKANE (1968) et de VANDESANDE et DIERICKX (1975) aient donné des résultats satisfaisants en raison de l'emploi d'immunosérums n'ayant qu'une affinité modérée pour leurs antigènes. Ces considérations soulignent la nécessité de tester pour chaque immunosérum employé la composition optimum du mélange éluant.

c) Techniques utilisant le traitement d'éluotion

1 - Mise en évidence successive de deux antigènes

α) Principe

.....

Nous l'avons déjà évoqué ci-dessus. En bref, il s'agit de révéler un antigène, de photographier le marquage, de faire disparaître ce marquage et les anticorps fixés, puis de révéler un antigène différent du premier.

β) Mode opératoire

.....

- Antigène 1 révélé par la méthode indirecte et le 4-chloro-1-naphtol donnant un précipité bleu.
- Montage des lamelles à la glycérine.
- Microphotographies.
- Démontage des lamelles.
- Lames plongées dans de l'eau contenant 10 p. 100 d'acétone. Passage dans l'acétone pure. Ces traitements éliminent totalement le précipité bleu.
- Les coupes ramenées dans l'eau sont ensuite plongées sous agitation pendant 1 mn dans le mélange composé de 1 volume de KMnO_4 à 2,5 p. 100, 1 volume de H_2SO_4 à 5 p. 100, 140 volumes d'eau distillée.
- La légère teinte brune est éliminée par un bain rapide dans le métabisulfite de Na à 0,5 p. 100.
- Les lames sont amenées dans l'eau puis dans le tampon et prêtes pour la deuxième réaction.
- Antigène 2 révélé par la méthode indirecte et l'un des deux chromagènes (DAB ou chloronaphtol).

REMARQUE : La révélation de la peroxydase dans la première réaction doit impérativement se faire avec le chloronaphtol. En effet, si le précipité bleu est facilement soluble dans les solvants organiques, celui que donne la DAB ne l'est pas. Le précipité brun peut être éliminé par une oxydation au permanganate-sulfurique, à condition d'utiliser un mélange concentré (1-1-10) agissant plusieurs minutes, ce qui ne peut être que néfaste à la deuxième réaction.

γ) Intérêt
.....

Cette technique permet de prouver que deux antigènes sont contenus dans une même cellule. Quand il s'agit d'une glande telle que l'hypophyse, elle n'a pas un caractère indispensable car les comparaisons peuvent être effectuées sur coupes adjacentes, chacune étant traitée par un immunosérum différent. La même cellule (10 à 15 μm) se retrouve facilement sur deux coupes de 3 à 4 μm d'épaisseur. Par contre, en ce qui concerne des structures telles que les fibres nerveuses dont la taille se situe autour du micron, il est obligatoire de réaliser les deux mises en évidence sur la même coupe pour prouver que les deux antigènes sont présents ensemble.

2 - Mise en évidence simultanée de deux antigènes

a) Principe
.....

Les deux (ou trois) antigènes sont révélés sur une préparation avec des précipités de couleur différente.

β) Mode opératoire
.....

Il est en tout point semblable au précédent, sauf que le temps de décoloration du premier précipité, est omis.

REMARQUE concernant l'ordre d'utilisation des deux chromogènes :

Avec la technique d'élution proposée, il est possible d'utiliser pour la première révélation soit la DAB soit le chloronaphtol. Le traitement au permanganate sulfurique n'affecte en rien le précipité bleu-violacé dû au chloronaphtol, si bien que pour obtenir une préparation bien lisible, il faudra surveiller l'apparition du précipité bleu de façon à ce qu'il ne devienne pas trop dense. Dans une telle éventualité, il pourrait, en fin de réaction être confondu avec le précipité brun foncé dû à la DAB.

En revanche, le traitement d'élution pratiqué après révélation à la DAB résulte en un éclaircissement du précipité brun qui devient jaune-orangé. Les préparations réalisées avec une réaction à la DAB suivie d'une réaction au chloronaphtol sont en conséquence, extrêmement nettes.

γ) Intérêt
.....

Cette méthode n'est utilisable que dans le cas où les deux antigènes sont localisés différemment. De sorte que, personnellement, nous ne lui accordons qu'un intérêt documentaire (Pl. II). Quand les deux antigènes révélés ont une même localisation, le mélange des deux précipités colorés donne une image difficilement interprétable.

CHAPITRE 2

HORMONES POLYPEPTIDIQUES ET SUBSTANCES
APPARENTEES DANS L'ADENOHYPOPHYSE.

I - CORTICOTROPINE et MELANOTROPINES

A - ETAT DES CONNAISSANCES

Jusqu'aux environs de 1960, tous les efforts déployés pour identifier les cellules hypophysaires responsables de la sécrétion d'ACTH n'avaient abouti qu'à des données contradictoires : selon les auteurs, l'élaboration de la corticotropine était attribuée soit aux cellules acidophiles, soit aux basophiles, soit aux chromophobes. L'essentiel des observations effectuées avant cette date a été analysé par PURVES (1961), SIPERSTEIN (1963) et GIROD (1964, 1976).

C'est à propos de l'identification des cellules corticotropes que la technique d'immunofluorescence fut appliquée pour la première fois à l'hypophyse (MARSHALL, 1951). Cette observation est cependant restée isolée et la validité des résultats fut même mise en doute sur des arguments d'ordre immunologique (CRUICKSHANK et CURRIE, 1958). Avec le travail de LEZNOFF et coll. (1962), commence une série de travaux d'immunohistochimie concernant les cellules corticotropes de l'hypophyse humaine (PEARSE et VAN NOORDEN, 1963 ; KRACHT et coll., 1965, 1966 ; HACHMEISTER et KRACHT, 1965 ; BROZMAN, 1967 ; PHIFER et coll., 1970). L'ACTH fut également mis en évidence dans des tumeurs extrahypophysaires responsables d'hypercorticisme (JARETT et coll., 1964). Parallèlement, nombre d'auteurs étudièrent les cellules corticotropes de divers Mammifères : le Rat (KRACHT et coll., 1965 ; SHIINO, 1967 ; BREUSTEDT, 1968 ; HESS et coll., 1968 ; NAKANE, 1968 ; BAKER et coll., 1970), les Ovins, Bovins et Porcins (DUBOIS, 1969, 1971, 1972 a et b), le Chien (KRACHT et coll., 1965 ; RICCI et RUSSOLO, 1968), le Cobaye (RUSSOLO et BET, 1969), un Lémurien de Madagascar *Microcebus murinus* (PERRET et coll., 1971), le rat d'Iran *Ellobius lutescens* (STEFAN et DUBOIS, 1972). GIROD (1976) répertorie 52 travaux, publiés entre 1951 et 1973, intéressants 17 espèces de Mammifères dont les cellules à ACTH furent caractérisées à l'aide d'antisérums dirigés soit contre l'ACTH d'extraction, soit contre des fragments synthétiques de la molécule.

Les divergences d'opinion concernant les caractères morphologiques de la cellule corticotrope, survenues avant que l'immunohistochimie ne se généralise, mettent en lumière quelques points importants :

- 1 - Les réactions tinctoriales pures ou même les réactions histochimiques dépendent à la fois de l'espèce animale considérée et de l'état sécrétoire de la cellule à ACTH. Dans ces conditions, il devient difficile d'extrapoler de l'hypophyse tumorale à l'hypophyse normale (chez l'homme) ou d'une espèce animale à une autre, sur la base des seuls résultats des colorations. La variabilité de la réaction à l'acide périodique-réactif de Schiff de la cellule corticotrope en fonction de données physiologiques ou spécifiques, illustre bien ces difficultés.
- 2 - Le critère de taille des grains de sécrétion retenu longtemps, en microscopie électronique, comme critère essentiel d'identification, est à considérer avec précaution. Le grain corticotrope du Rat mesure environ 2000 Å alors que celui de l'Homme ou du Léroty peut atteindre 5000 Å.

Certains travaux sur l'identification immunohisto- chimique des cellules corticotropes rapportèrent, en plus du marquage d'un type cellulaire du lobe antérieur, le marquage en totalité du lobe intermédiaire par les anticorps anti-ACTH. Jusque là, il était implicitement admis que le lobe antérieur de l'hypophyse était responsable de l'élaboration d'ACTH, tandis que la sécrétion de MSH était attribuée au lobe intermédiaire. Cependant, quelques résultats avaient déjà suggéré l'existence de relations entre lobe intermédiaire et fonction corticotrope. En effet, une activité ACTH-like avait été mise en évidence dans l'ensemble difficilement dissociable formé par les lobes nerveux et intermédiaire (MIALHE-VOLOSS, 1958 ; ROCHEFORT et coll., 1959). Plus récemment, GOSBEE et coll. (1970), montrèrent que la surrénalectomie provoquait d'importantes modifications morphologiques du lobe intermédiaire, suggérant son intervention dans la production fonctionnelle d'ACTH. D'autres résultats rapportèrent la présence de cellules possédant les caractères morphologiques des cellules cortico- tropes dans la portion rostrale du lobe intermédiaire (PORTE et coll., 1971 ; STOECKEL et coll., 1971) et celle d'ACTH biologiquement actif dans des lobes inter- médiaires isolés (KRAICER et coll., 1971). La présence d'ACTH immunoréactif concordait donc avec ces résultats. Cependant, le marquage obtenu avec des anti- corps dirigés soit contre l'ACTH total, soit contre le fragment 1-24 de la molé- cule, pouvait aussi être dû à une réaction immunologique croisée entre ACTH et α -MSH : la molécule d' α -MSH est, en effet, constituée par les 13 premiers acides aminés de l'ACTH (voir fig. 13). L'utilisation d'anticorps dirigés contre le 17-39ACTH qui ne possède aucune séquence commune avec α -MSH, devait lever le doute : la réaction positive du lobe intermédiaire à ces anticorps confirmait la

présence dans ce lobe, d'une molécule apparentée à la partie C-terminale de l'ACTH (PHIFER et SPICER, 1970 ; BAKER et DRUMMOND, 1972 ; MORIARTY et HALMI, 1972 a et b ; DUBOIS et coll., 1973 ; NAIK, 1973 ; GIROD et DUBOIS, 1974). Cependant, la caractérisation récente dans le lobe intermédiaire uniquement, d'un nouveau peptide constitué par la séquence 18-39 de l'ACTH (Corticotrophin-like intermediate lobe peptide ou CLIP) remet en question la présence d'ACTH vrai dans ce lobe (SCOTT et coll., 1972, 1973, 1974 a et b).

Le problème de l'origine cellulaire des mélanotropines α et β fut également abordé grâce à l'immunohistochimie. Classiquement, l'essentiel de l'activité mélanotrope était attribué au lobe intermédiaire sécrétant l'interméline (ou mélanotropine MSH) et la faible activité du lobe antérieur, à l'ACTH dont l'action sur l'expansion des mélanophores de la peau de Batracien avait été démontrée (HOWE et THODY, 1970). Cependant deux peptides à forte activité mélanotrope (α -MSH et β -MSH) avaient été isolés à partir de l'hypophyse, sans que la part de chacun d'eux dans l'activité MSH totale puisse être précisée. En outre, une intrication au moins partielle des fonctions corticotrope et mélanotrope était suggérée : par exemple, les taux sanguins de β -MSH s'avéraient être modulés par le feed-back des sécrétions corticosurréaliennes (POMERANTZ et CHANG, 1970). La corrélation entre MSH et lobe intermédiaire ne pouvait pas être absolue. En effet, chez l'Homme, l'existence d'une activité mélanotrope dans une hypophyse dépourvue de lobe intermédiaire impliquait la sécrétion de MSH par le lobe antérieur. Cette sécrétion était d'ailleurs attribuée depuis longtemps aux cellules β de ROMEIS (1940) encore appelées β (R) par PEARSE et VAN NOORDEN (1963). Les premiers résultats obtenus par immunohistochimie avaient conclu à la présence d'ACTH immunoréactif dans ces cellules (PHIFER et coll., 1970).

L'intrication des sécrétions MSH et ACTH déjà fortement suggérée par la présence d'ACTH dans le lobe intermédiaire devait être confirmée par la mise en évidence par immunofluorescence de la β -MSH dans un ensemble cellulaire englobant la totalité du lobe intermédiaire et les cellules corticotropes du lobe antérieur (PHIFER et coll., 1970 ; DUBOIS, 1972 a ; STEFAN et DUBOIS, 1972). L' α -MSH semblait toutefois être exclusivement localisée dans le lobe intermédiaire (DUBOIS, 1972 a ; STEFAN et DUBOIS, 1972).

B - RECHERCHES PERSONNELLES

1°) Reconnaissance immunohistochimique des cellules corticotropes

Dans un premier temps, les techniques immunohistochimiques ont été utilisées pour décrire et caractériser morphologiquement le type cellulaire responsable de l'élaboration de corticotropine.

C'est chez le Lérot où les caractéristiques tinctoriales et morphologiques de l'hypophyse sont très tranchées que les meilleures comparaisons entre immunohistochimie d'une part et colorations ou ultrastructure d'autre part, ont pu être réalisées.

a) Caractères tinctoriaux et histochimiques

Pour cette étude, la reconnaissance immunohistochimique est pratiquée sur une coupe et la coloration sur une coupe adjacente. Pour effectuer une reconnaissance et des comparaisons cellule à cellule, il est nécessaire d'utiliser des coupes d'une épaisseur de 2 μ . Les colorations employées ont été volontairement limitées au tétrachrome de Herlant et à une technique utilisant la réaction PAS (PAS-orange G ou encore PAS-Bleu Alcian-orange G).

1 - Chez le Lérot (Pl. III)

La cellule corticotrope est fortement colorée par le bleu d'aniline et présente une intense réaction au PAS. Une coupe suffisamment fine permet de constater que la coloration reste limitée aux seuls grains de sécrétion. De tous les types cellulaires, c'est celui qui présente les caractères "basophiles" les plus accusés.

Les cellules corticotropes sont ovoïdes, possèdent un noyau à nucléole volumineux, et des grains sécrétoires de grande taille autant qu'on puisse en juger en microscopie photonique.

2 - Chez le Cobaye

Chez cet animal, la cellule corticotrope est peu chromophile et présente une réaction très modérée au PAS. Les cellules gonadotropes et thyroïdotropes sont caractérisées par une basophilie beaucoup plus importante que celle des corticotropes.

Les cellules corticotropes du Cobaye ont des formes variées mais généralement anguleuses. Les prolongements cytoplasmiques s'insinuant entre les cellules voisines sont nombreux. Les grains cytoplasmiques ne sont pas visibles après coloration.

b) Caractères ultrastructuraux (Pl. IV)

La méthode de superposition d'images photoniques et électroniques, qu'en collaboration avec J.C. BEAUVILLAIN, nous avons mise au point, a été pour la première fois appliquée chez le Lérot, aux cellules corticotropes dont les caractères ultrastructuraux ont pu être précisés (BEAUVILLAIN et TRAMU, 1973). Cette méthode et d'autres, ont permis également à J.C. BEAUVILLAIN dans sa thèse de déterminer les caractères ultrastructuraux des cellules corticotropes du Cobaye ainsi que ceux des autres types cellulaires de l'hypophyse du Lérot et du Cobaye.

2°) Répartition des cellules fixant les anticorticotropines

a) Chez le Cobaye

1 - Anticorps dirigés contre la moitié COOH terminale de l'ACTH (Pl. V)

Les immunosérums anti-17-39ACTH révèlent de très nombreuses cellules dans tout le lobe antérieur. Ces cellules sont particulièrement abondantes dans la zone rostrale de l'hypophyse où on les trouve groupées, parfois en très larges amas. Leur aire de répartition s'étend vers l'arrière de l'hypophyse en formant des sortes de trainées cellulaires bien visibles sur des coupes sagittales. La trainée médiane est la plus importante et chez certains animaux, elle apparaît très nettement délimitée (Pl. V, A).

Malgré leur topographie rostrale préférentielle, il est exceptionnel d'en trouver dans la *pars tuberalis* s'étendant vers l'avant, à la base de l'éminence médiane. Dans cette région hypophysaire remarquable, séparée du tissu nerveux par les vaisseaux du plexus porte, seules parmi les hormones

pituitaires connues, les gonadotropines semblent être élaborées. Les cellules gonadotropes représentent cependant moins de 10 p. 100 de l'ensemble, les autres étant ce qu'il est convenu d'appeler cellules chromophobes en attendant de connaître leur rôle (TRAMU et DUBOIS, 1972).

Les anticorps anti-17-39ACTH se fixent aussi très intensément sur l'ensemble des cellules du lobe intermédiaire. Les immunosérums provenant de quatre lapins différents tous immunisés contre le 17-39ACTH de synthèse, donnent des résultats strictement superposables. Seule l'intensité de la réaction varie légèrement selon le sérum, vraisemblablement en relation avec le titre en anticorps.

L'anti-25-39ACTH que nous avons utilisé donne des résultats en tous points semblables à ceux qu'avaient fourni les immunosérums anti-17-39ACTH.

2 - Anticorps dirigés contre la moitié NH₂ terminale de l'ACTH

Dans le lobe antérieur, les deux immunosérums anti-1-24ACTH utilisés marquent des cellules qui, par leur aspect, leur répartition et leur nombre sont apparemment proches des cellules marquées par les anti-17-39ACTH.

Dans le lobe intermédiaire, un des deux antisérums (1-24 D) donne une réaction extrêmement variable selon les animaux : elle peut être presque inexistante chez certains et très intense chez d'autres avec tous les intermédiaires entre ces deux extrêmes. Le deuxième antisérum (69-150374) donne une réaction à la fois plus nette et plus constante que le premier.

REMARQUE : Au cours de nos essais pour estimer l'incidence de la nature du fixateur sur la préservation de l'immunoréactivité des hormones hypophysaires, une particularité a retenu notre attention. Après fixation par le mélange de Carnoy la réaction anti-1-24ACTH est extrêmement différente, d'une part dans les cellules corticotropes du lobe antérieur et d'autre part dans les cellules du lobe intermédiaire. Dans la cellule corticotrope, le marquage intéresse l'ensemble du cytoplasme (Pl. X, I) alors que dans la cellule du lobe intermédiaire la réaction cytoplasmique est faible ou modérée et la zone golgienne juxta-nucléaire est fortement immunoréactive (Pl. VI, B et C).

Des réactions sensiblement identiques aux réactions anti-1-24ACTH sont obtenues avec un immunsérum dirigé contre le 1-16ACTH. L'intensité du marquage est toutefois plus faible, probablement en raison d'un titre inférieur en immunoglobuline.

3 - Anticorps dirigés contre le tronçon médian 11-24ACTH

Cet anticorps ne se fixe pas sur les cellules du lobe intermédiaire, mais il marque des cellules du lobe antérieur. Sur coupes adjacentes, la comparaison de la réaction anti-11-24ACTH avec des marquages anti-1-24ACTH ou 17-39ACTH, montre qu'une partie seulement des cellules corticotropes réagit.

4 - Différences individuelles dans les marquages anti-corticotropine

Nos observations ont porté sur des hypophyses de jeunes adultes mâles ou femelles et sur des femelles gravides en fin de gestation.

Nous n'avons pas noté de différences significatives pouvant être en relation avec le sexe. Chez la femelle, toutefois, la période de fin de gestation est caractérisée par une hyperplasie des cellules corticotropes et semble-t-il également du lobe intermédiaire (Pl. V, B). Peu avant la mise bas, les cellules hypophysaires qui élaborent les hormones polypeptidiques présentent donc des signes morphologiques d'hyperactivité. A notre connaissance, aucune donnée classique de la littérature ne fait état d'une hypersécrétion corticotrope pendant la gestation, la parturition ou la lactation.

b) Chez le Lérot

1 - Anticorps dirigés contre la moitié NH₂ terminale de l'ACTH

Les immunsérums anti-1-24ACTH provoquent le marquage extrêmement net de nombreuses cellules dans le lobe antérieur et de quelques cellules du lobe intermédiaire (Pl. VII, A).

Les cellules marquées sont de grande taille, réparties dans tout le lobe antérieur avec cependant une concentration plus forte dans les régions antéro-latérales de la glande où elles constituent le type cellulaire le plus abondant. Des plages formées d'une vingtaine de cellules jointives n'y sont pas exceptionnelles.

Les cellules immunoréactives sont également présentes dans le lobe intermédiaire. Mais, en dépit de l'extrême exigüité de celui-ci (voir fig. 1), toutes les cellules qui le composent ne réagissent pas à l'immunsérum. Les cellules marquées sont plus abondantes dans la zone rostrale là où le lobe intermédiaire rejoint le lobe antérieur, et deviennent plus rares dans la zone caudale alors que le lobe intermédiaire se résoud en une assise cellulaire plaquée contre le lobe nerveux.

Les deux anti-1-24ACTH utilisés donnent des résultats complètement identiques. Rappelons que chez le Cobaye les mêmes immunsérums ont été employés et que si, les résultats étaient comparables dans le lobe antérieur, ils différeraient souvent dans le lobe intermédiaire.

Chez le Lérot, ni l'immunsérum anti-1-16ACTH ni l'anti-11-24ACTH n'ont été utilisés.

2 - Anticorps dirigés contre la moitié COOH terminale de l'ACTH

Sur les quatre immunsérums anti-17-39ACTH que nous avons utilisés deux ne se fixent pas sur l'hypophyse du Lérot (sérums 19512 et 19514). Les deux autres (19513 et 19515) donnent, par contre, des réactions

extrêmement nettes qui, dans leur aspect général, sont très proches de la réaction obtenue avec les anti-1-24ACTH.

REMARQUE concernant l'obtention des immunsérums :

Il apparaît que les deux immunsérums non réactifs ont été produits en immunisant des lapins contre le tronçon 17-39 de l'ACTH couplé à une albumine par l'intermédiaire du toluène diisocyanate (SCHICK et SINGER (1961)). Pour les deux sérums réactifs, c'est le glutaraldéhyde qui a servi d'agent couplant. Ce dernier réalise des pontages sur l'extrémité NH_2 alors que le toluène diisocyanate couple la protéine aussi bien sur le NH_2 que sur le COOH terminal du peptide.

De ces considérations, il ressort que l'immunogène produit par couplage au glutaraldéhyde induira plus d'anticorps dirigés contre l'extrémité COOH restée libre, que l'immunogène produit par couplage au toluène diisocyanate.

Dans le cas du Lérot, il est possible que la fixation de l'immunsérum soit conditionnée par l'existence de sites anticorps dirigés contre l'extrémité COOH de l'ACTH. C'est en tout cas une des interprétations qui justifierait les particularités de la réaction anti-17-39ACTH observées dans cette espèce.

L'immunsérum anti-25-39ACTH, provenant d'un lapin immunisé contre le peptide couplé à l'albumine par l'intermédiaire du glutaraldéhyde, induit des marquages analogues à ceux obtenus avec les anti-17-39ACTH réactifs et les anti-1-24-ACTH. Cette observation est en accord avec la présence d'un déterminant antigénique majeur placé à l'extrémité COOH de la molécule d'ACTH 1-39.

3 - Cellules corticotropes au cours du cycle annuel

La cytologie adénohypophysaire du Lérot a été étudiée aussi bien après examen histologique classique qu'après immunohistochimie (TRAMU et coll., 1974 a). L'involution des cellules gonadotropes pendant l'hiver puis leur spectaculaire hyperplasie au moment du réveil, ont été très bien observées. Par contre, en ce qui concerne les cellules corticotropes, et

bien que des différences individuelles existent, aucune modification significative n'a pu être rattachée à une phase quelconque du cycle annuel. Tout au long de l'année, ce type cellulaire est numériquement très représenté et l'aspect des cellules évoque une activité sécrétoire permanente.

3°) Répartition des cellules fixant les antimélanotropines

a) Chez le Cobaye

1 - Anticorps dirigés contre l' α -MSH

Deux immunsérums anti- α -MSH provenant de lapins différents donnent des résultats rigoureusement concordants. En effet, ils se fixent intensément et de façon homogène sur l'ensemble des cellules du lobe intermédiaire. Aucune cellule du lobe antérieur n'est marquée (Pl. VIII, B), en ce qui concerne la majeure partie des animaux étudiés. Chez quelques uns cependant, de très rares cellules du lobe antérieur réagissent, mais elles sont toujours situées au voisinage immédiat du lobe intermédiaire dans des zones où la fente hypophysaire est absente.

REMARQUE : Après fixation au mélange de Carnoy, une réaction limitée au lobe intermédiaire est observée, mais dans la zone rostrale de ce lobe, certaines cellules sont nettement plus réactives que les autres (Pl. VIII, D). Cette particularité, qui n'est observable avec aucun des autres fixateurs utilisés demeure inexplicée mais a l'intérêt de souligner l'importante incidence de la fixation de l'antigène sur sa future liaison avec l'anticorps.

2 - Anticorps dirigés contre la β -MSH

Aucune réaction n'est obtenue sur l'hypophyse du Cobaye, après utilisation de deux immunsérums d'origine différente. Dans la gamme des mélanges fixateurs utilisés en Histologie, onze ont été testés sur l'hypophyse du Cobaye. Quel que soit le fixateur, la réaction anti- β -MSH s'est révélée négative. Rappelons que les deux immunsérums nous ont été fournis par

le Dr DUBOIS (Nouzilly). Ils ont été largement utilisés en France par de nombreux auteurs sur des espèces variées et ont toujours donné des marquages hypophysaires nets. Nos essais personnels chez le Lérot, le Rat et le Mérion ont démontré l'existence dans ces trois espèces de cellules β -mélantropes. Dans ces conditions, on ne peut que conclure à l'absence de β -MSH immunoréactive chez le Cobaye.

b) Chez le Lérot

1 - Anticorps dirigés contre l' α -MSH

Les réactions données par les deux immunsérums dont nous disposons sont analogues et remarquablement circonscrites à quelques cellules du lobe intermédiaire (Pl. IX, A). Sur une coupe sagittale donnée, dans l'ensemble du lobe intermédiaire le nombre total de cellules immunoréactives dépasse rarement la dizaine. Le faible développement du lobe intermédiaire (fig. 1) ajouté au fait que les cellules α -mélantropes ne représentent qu'une partie des cellules de ce lobe, souligne bien la faible importance numérique des éléments élaborateurs d' α -MSH dans l'hypophyse du Lérot. Il est de plus frappant, qu'en dépit de son volume, le lobe intermédiaire soit la seule zone hypophysaire où l'on rencontre des cellules α -mélantropes. On admet généralement, que dans les espèces dépourvues de lobe intermédiaire, les cellules élaborant l'"interméline" sont distribuées dans le lobe antérieur. Dans le cas du Lérot, cette hypothèse est à écarter.

La stricte association entre α -MSH et lobe intermédiaire évoque également l'existence d'une étroite relation entre la sécrétion d' α -MSH et le lobe nerveux voisin.

REMARQUE : Le lobe intermédiaire du Lérot possède de plus la particularité de présenter une composition cellulaire hétérogène. Il n'est pas exclusivement formé de cellules élaborant des hormones polypeptidiques comme c'est la règle chez les autres Mammifères. En effet, après coloration, de typiques cellules somatotropes y sont reconnaissables. L'immunohistochimie confirme le fait et permet en outre d'y détecter de très rares cellules gonadotropes.

2 - Anticorps dirigés contre la β -MSH (Pl. VII, B et D ; Pl. IX, B)

Contrairement à ce qui a été observé chez le Cobaye, les anticorps anti- β -MSH se fixent sur un grand nombre de cellules situées aussi bien d'un côté que de l'autre de la fente hypophysaire. Apparemment, le marquage est proche de celui que donnaient les anti-ACTH. Cependant, dans le lobe intermédiaire où un nombre important de cellules réagit, quelques éléments présentent une immunoréactivité nettement supérieure à celle des autres, et cela, tout particulièrement visible en immunofluorescence (Pl. IX, B), apparaît aussi en immunoperoxydase (Pl. XIII, D). Cette particularité nous a conduit à effectuer des réactions comparatives destinées à préciser la nature de ces cellules (voir paragraphe 5°, c , 2 - du même chapitre).

4°) Répartition des cellules fixant les anticorps dirigés contre le 4-10ACTH

Le 4-10ACTH représente la séquence commune à l'ACTH et aux MSH (Fig. 13, p. 68). Comme on peut le constater sur les figures 13 (p.68) et 14 (p.69), cette séquence est donc présente dans les unités peptidiques suivantes : β -LPH, γ -LPH, β -MSH, α -MSH et ACTH.

a) Chez le Cobaye

La réaction dirigée contre le 4-10ACTH est plus ou moins prononcée selon les individus, mais elle est toujours nette et exclusivement localisée aux cellules du lobe intermédiaire (Pl. VIII, A). Le marquage se répartit sur l'ensemble du cytoplasme avec un aspect finement granuleux. Il peut considérablement varier d'une cellule à l'autre. Certaines cellules peuvent être même totalement négatives (Pl. XIV, A) ce qui n'est que rarement le cas avec les anticorps anti-MSH et anti-ACTH.

La première déduction que l'on peut tirer du marquage exclusif des cellules du lobe intermédiaire est que le tronçon peptidique 4-10 bien qu'existant sûrement dans les cellules corticotropes et dans toutes les cellules du lobe intermédiaire, n'est pas toujours accessible aux anticorps spécifiques dirigés contre lui.

b) Chez le Lérot

Une réaction nette a été observée chez tous les animaux examinés, mais dans cette espèce, comme chez le Cobaye, elle n'intéresse manifestement pas toutes les cellules élaborant les hormones polypeptidiques (Pl. XV, A à E). Leur nombre est variable selon les individus, mais elles sont toujours situées dans la moitié caudale de l'adénohypophyse dans une zone assez proche du lobe nerveux (Pl. XV, B). Les régions antéroventrales où pourtant abondent les cellules fixant les anti-ACTH et anti- β -MSH, peuvent être totalement dépourvues de cellules marquées par l'anti-4-10ACTH.

Dans cette espèce aussi, le tronçon heptapeptidique ne semble pas devoir être toujours accessible aux immunoglobulines spécifiques.

5°) Comparaisons entre certaines réactions précédemment décrites

En première approximation, par la simple observation de coupes voisines, il est facile de constater que les réactions dirigées contre les fragments de l'ACTH et contre les MSH, intéressent une même catégorie cellulaire. Cependant, il n'est pas possible d'affirmer, par exemple, que toutes les cellules marquées par les anti-ACTH, le sont par l'anti- β -MSH (cas du Lérot), ou *vice-versa*. Seules des comparaisons précises permettront une certitude.

Dans le lobe antérieur, véritable mosaïque de types cellulaires, la réaction immunohistochimique dirigée contre une hormone donnée se traduit par le marquage de certaines cellules se détachant sur fond de cellules non immunoréactives. Les comparaisons effectuées sur coupes adjacentes à condition que celles-ci soient fines, sont suffisantes. Par contre, les cellules du lobe intermédiaire réagissent souvent dans leur ensemble (cas du Cobaye). Les cellules jointives, toutes marquées, rendent donc les mêmes comparaisons beaucoup plus aléatoires. Le recours au marquage successif de deux antigènes sur une même coupe devient donc souvent indispensable (voir chapitre Matériel et Méthodes).

a) Réactions anti-corticotropines dans le lobe antérieur

Les comparaisons ont été effectuées sur coupes adjacentes d'une épaisseur de 2 μ m, entre les marquages dûs à l'anti-17-39ACTH (19513), l'anti-25-39ACTH et l'anti-1-24ACTH (69).

1 - Chez le Cobaye (Pl. X)

Les comparaisons montrent que les cellules marquées avec l'un des trois immunosérums, le sont également par les deux autres. Ce résultat est obtenu aussi bien après fixation au mélange de Stieve (Pl. X, à gauche) qu'après fixation au mélange de Carnoy (Pl. X, à droite) ou aux autres fixateurs testés.

En outre, on peut constater que le degré d'immuno-réactivité d'une cellule n'est pas dépendant de l'immunosérum utilisé : une cellule réagissant faiblement à l'anticorps anti-1-24ACTH, réagit aussi faiblement aux anticorps dirigés contre la portion COOH de l'ACTH. De même, une réaction forte sur une cellule, se retrouve avec les trois immunosérums.

2 - Chez le Léroto (Pl. IX C et D ; Pl. VII)

Le même procédé de comparaison de coupes adjacentes donne des résultats identiques à ceux qui viennent d'être rapportés chez le Cobaye.

Il semble donc que, dans les deux espèces, les anti-corticotropines révèlent la même molécule dans les cellules du lobe antérieur, et que vraisemblablement, les mêmes sites intracytoplasmiques sont marqués.

b) Réactions anti-corticotropines dans le lobe intermédiaire

1 - Chez le Cobaye (Pl. XI)

Les comparaisons concernant le lobe antérieur et le lobe intermédiaire ont été conduites chez les mêmes animaux.

D'une manière générale, comme nous l'avons noté précédemment, les anti-17-39ACTH et anti-25-39ACTH donnent un marquage important et homogène sur les cellules du lobe intermédiaire. L'anti-1-24ACTH, au contraire ne semble pas se fixer de façon identique sur toutes les cellules et les variations individuelles dans l'intensité de marquage sont importantes.

Les comparaisons de coupes adjacentes montrent effectivement, que certaines cellules bien marquées par l'anti-17-39ACTH et l'anti-25-39ACTH ne présentent pratiquement aucune réaction à l'anti-1-24ACTH alors que dans le même champ microscopique, il est possible de voir des cellules qui réagissent de façon analogue (Pl. XI, E à G).

Ces observations renouvelées chez plusieurs animaux tendent donc à montrer que si les immunosérums se fixent sur la molécule d'ACTH, celle-ci n'existe pas sous la même forme dans le lobe antérieur et dans le lobe intermédiaire.

2 - Chez le Lérot

Des comparaisons concernant la localisation des marquages anti-corticotropines n'ont pas été effectuées systématiquement sur le lobe intermédiaire du Lérot. Cependant, il est possible de constater que l'anti-17-39ACTH y marque les mêmes cellules que l'anti-1-24ACTH (Pl. IX, C et D) et que ces cellules sont différentes de celles qui fixent les anti- α -MSH (Pl. XIII, A et B). Nous développons plus loin cette question.

c) Comparaisons entre les marquages anti- α -MSH et anti-ACTH dans le lobe intermédiaire

Selon SCOTT et coll. (1972, 1973, 1974 a et b), le lobe intermédiaire est caractérisé par la présence d'un peptide formé par la séquence 18-39 de l'ACTH. Il s'agit du "Corticotropin-like intermediate lobe peptide" ou CLIP. Ces auteurs avancent l'hypothèse d'une origine commune à partir de la molécule d'ACTH (1-39) pour les deux peptides typiques du lobe intermédiaire : l' α -MSH (1-13) et le CLIP (18-39).

C'est pourquoi des comparaisons ont été menées entre les réactions dirigées contre l' α -MSH et contre le 17-39ACTH.

1 - Chez le Cobaye

Par la méthode des marquages successifs, les investigations ont été conduites chez quatre animaux (deux mâles et deux femelles) et les résultats obtenus concordent.

Sans être parfaitement identiques, les marquages anti- α -MSH et anti-17-39ACTH (sérum 19513) sont superposables. C'est-à-dire que l'immuno-réactivité d'une cellule donnée est en général la même, quel que soit l'immuno-sérum (Pl. XII, A et B). Cependant, certaines cellules réagissant bien à l'anti-17-39ACTH réagissent beaucoup moins à l'anti- α -MSH (Pl. XII, C et D). Il semble donc que deux substances proches l'une de l' α -MSH, l'autre du 17-39ACTH coexistent dans une même cellule, mais qu'à un instant donné, leurs taux respectifs puissent diverger dans certaines cellules.

REMARQUE : Cas particulier de la fixation au mélange de Carnoy. Sur des coupes adjacentes de 5 μ d'épaisseur, les réactions anti- α -MSH, anti-1-24ACTH et anti-25-39ACTH ont été comparées (Pl. VI, A à D et VIII, C et D). Les anti-1-24ACTH et tout particulièrement le D. 1-24 donnent un marquage extrêmement caractéristique de la zone golgienne des cellules, très différent du marquage anti- α -MSH réparti de façon homogène dans le cytoplasme. La réaction anti-25-39ACTH analogue à la réaction anti-17-39ACTH se rapproche du marquage anti- α -MSH.

Ces comparaisons permettent de souligner les différences importantes existant entre marquages anti- α -MSH et anti-ACTH NH₂ terminal, mais également confirment les analogies existant entre marquages anti- α -MSH et anti-ACTH COOH terminal.

La nette différence de marquage de la zone golgienne constatée selon que l'anti-1-24ACTH ou l'anti-17-39ACTH sont utilisés, est à rapprocher de l'observation de MORIARTY (1977) : en microscopie électronique, alors que les granules cytoplasmiques de la cellule du lobe intermédiaire sont marqués fortement par un anti-17-39ACTH, la plupart de ceux qui sont localisés dans l'appareil de Golgi, ne réagissent pas.

2 - Chez le Léro

Sur coupes adjacentes (Pl. IX), ou en pratiquant des marquages successifs (Pl. XIII A et B), on peut constater que les cellules du lobe intermédiaire fixant les anti- α -MSH ne réagissent ni aux anti-17-39ACTH, ni aux anti-1-24ACTH.

Le cas du Léro est donc à cet égard, différent de celui du Cobaye. En effet, la molécule d' α -MSH est présente dans des cellules qui ne contiennent pas la molécule d'ACTH, alors que d'autres cellules voisines, dans le même temps réagissent très bien aux deux anticorticotropines.

d) Comparaison entre les marquages anti- α -MSH et anti-4-10ACTH chez le Cobaye

Etant donné le marquage du seul lobe intermédiaire par l'immunsérum anti-4-10ACTH, il était logique d'envisager l'éventualité d'une réaction croisée avec l' α -MSH. Des comparaisons entre les marquages dirigés soit contre l'heptapeptide 4-10ACTH, soit contre l' α -MSH ont été effectuées chez cinq animaux. Chez un de ces animaux qui ne présentait qu'une réaction anti-4-10ACTH modérée, les marquages spécifiques de chacune des deux séquences peptidiques peuvent être superposés (Pl. XIV, C et D). Par contre, chez les quatre autres, les marquages diffèrent nettement. Certaines cellules fixant bien les anticorps anti- α -MSH ne fixent pas l'anti-4-10ACTH. D'autres, fortement

immunoréactives aux anti-4-10ACTH ne réagissent que modérément aux anti- α -MSH (Pl. XIV, A et B).

Ces résultats suggèrent que, dans quelques cas, la réaction dirigée contre le 4-10ACTH pourrait être due à la présence d' α -MSH mais aussi que dans la plupart des cas un peptide différent de l' α -MSH est révélé.

e) Comparaison entre marquage anti-4-10ACTH et anti-ACTH chez le Lérot

Sur coupes adjacentes (Pl. XV), il est possible de constater que les cellules réagissant à l'anti-4-10ACTH font partie de la catégorie cellulaire élaborant l'ACTH. Toutes ces cellules ne fixent manifestement pas les anticorps dirigés contre l'heptapeptide.

Nos comparaisons entre réaction anti- α -MSH et réaction anti-4-10ACTH n'ont jamais montré d'exemples de superpositions de marquage, mais cela n'exclut pas complètement la possibilité de leur existence.

Chez le Lérot donc, sous une forme un peu différente de celle du Cobaye, l'immunoréactivité anti-4-10ACTH concerne bien des cellules élaborant des hormones de la famille peptidique de l'ACTH/MSH, mais seulement une partie d'entre elles.

C - DISCUSSION

Les résultats relatifs à la localisation hypophysaire des sites élaborateurs des corticotropine et mélanotropines font ressortir plusieurs notions étroitement dépendantes les unes des autres. Cependant, pour la commodité et la clarté de l'exposé, nous présenterons cette discussion sous forme de plusieurs paragraphes, chacun d'entre eux étant centré sur un problème particulier.

1°) Spécificité des immunsérums

Toutes les méthodes qui ont servi à tester les immunsérums utilisés concluent à l'excellente spécificité des réactions obtenues. En dépit des étroites parentés chimiques existant entre les molécules ou les tronçons de molécule utilisés pour cette étude immunocytochimique (Fig. 13 et 14 p. 68 et 69), on peut dire que le marquage obtenu sur coupe est, pour l'essentiel, dû à la présence de l'antigène contre lequel est dirigé l'anticorps. Comme le montrent les tests d'immunohémolyse passive indirecte, des réactions croisées existent certainement mais elles n'interviennent vraisemblablement que pour une faible part, étant donné que seul l'antigène homologue est capable d'éliminer le marquage immunohistochimique. L'absorption préalable de l'anti-sérum par un antigène hétérologue ne paraît dans la plupart des cas, pas même diminuer ce marquage. Certains exemples montrent que les réactions dirigées contre les peptides hypophysaires peuvent être caractérisées par une forte, voire surprenante, spécificité. C'est le cas rapporté par CHATELAIN et coll. (1979) de l'effet d'une absorption préalable par β -LPH de l'immunsérum anti- β -MSH. Alors que la β -LPH contient la séquence complète de β -MSH (voir fig. 14, p. 69), une telle saturation n'inhibe pas la fixation des anticorps anti- β -MSH sur les cellules corticotropes du rat. Par contre, une saturation par γ -LPH (γ -LPH = β -LPH 1-58) de l'anti- β -MSH (β MSH = β -LPH 41-58) inhibe totalement cette fixation. Il apparaît donc que l'extrémité carboxyl libre en position 58 est indispensable à la bonne fixation des anti- β -MSH.

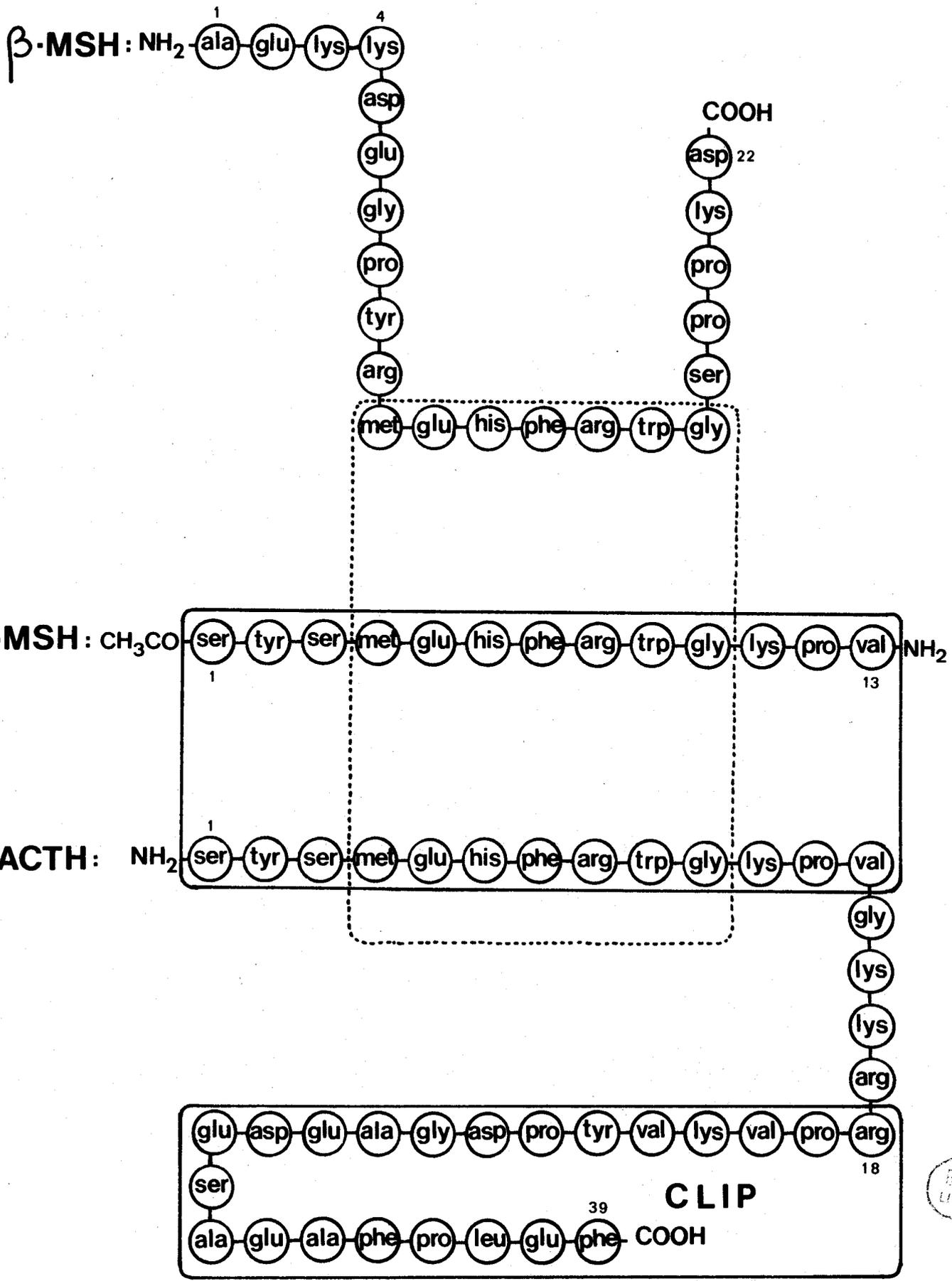
FIGURE 13

Séquences peptidiques de la corticotropine et des mélanotropines humaines.

Dans les autres espèces de Mammifères pour lesquelles elle est connue, la β -MSH ne possède pas les quatre premiers acides aminés.

Le cadre en pointillés met en relief l'heptapeptide commun aux trois séquences.

Les cadres en trait plein montrent d'une part la communauté de la séquence 1-13 pour α -MSH et ACTH et d'autre part la séquence 18-39 de l'ACTH (CLIP).



BNS
LILLE

F I G U R E 14

Séquence peptidique de la β -LPH humaine et ses rapports
avec les peptides voisins :

γ -LPH = β -LPH 1 - 58

β -MSH = β -LPH 37 -58

et 41 - 58 dans les autres espèces de Mammifères.

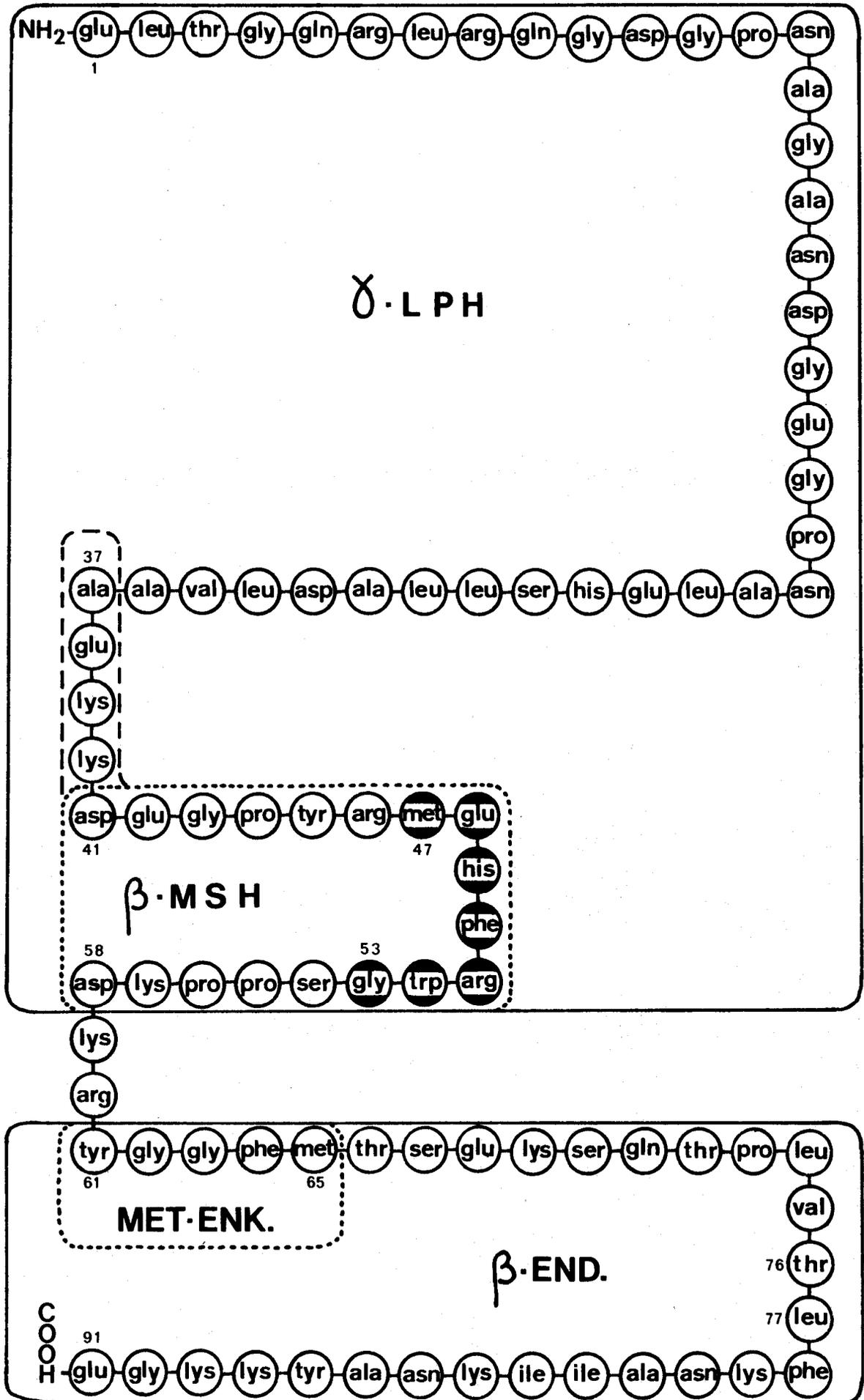
β -endorphine = β -LPH 61 - 91

α -endorphine = β -LPH 61 - 76

γ -endorphine = β -LPH 61 - 77

Méthionine-enképhaline = β -LPH 61 - 65

La séquence commune avec α -MSH et ACTH est située en 47 - 53.



Un exemple analogue est fourni par la réaction anti- α -endorphine (α -endorphine = β -LPH 61-76) que ni la β -LPH 1-91, ni la β -endorphine (β -endorphine = β -LPH 61-91) ne sont capables d'éliminer (BEGEOT et coll., 1978). Là aussi, la vacuité de l'extrémité COOH en position 76 paraît requise pour la bonne fixation de l'anti- α -endorphine.

Nos résultats apportent également une contribution à cette notion : chez le Cobaye, en effet, la réaction anti-4-10ACTH sur le lobe intermédiaire n'est inhibée ni par le 1-24ACTH, ni par α -MSH. Les anticorps anti-4-10ACTH ne semblent donc pas pouvoir se lier à l'heptapeptide quand il est incorporé complètement dans une chaîne peptidique, comme c'est le cas dans 1-24ACTH et α -MSH. Cette interprétation est d'ailleurs en accord avec l'absence de fixation des anticorps anti 4-10ACTH sur les cellules corticotropes du lobe antérieur. On peut dès maintenant remarquer que le corollaire serait que le lobe intermédiaire peut élaborer une molécule ressemblant au 4-10ACTH et qui posséderait soit l'extrémité COOH libre, soit l'extrémité NH₂ libre, soit même les deux extrémités libres.

2°) ACTH dans le lobe antérieur

Chez le Cobaye, comme chez le Lérot, les résultats des marquages anti-ACTH sont en accord avec les données fournies par des études analogues réalisées chez de nombreux autres Mammifères. Dans sa totalité, un type cellulaire est caractérisé par les immunsérums dirigés contre 1-24, 1-16, 17-39 et 25-39ACTH. Le fait que l'anticorps anti-11-24ACTH ne se fixe qu'incomplètement pourrait s'interpréter, là encore, par l'absence physiologique d'un tronçon 11-24 possédant une extrémité libre.

En ce qui concerne l'hypophyse du Lérot, on peut également noter que si l'on fait abstraction des critères purement morphologiques, la distinction entre le lobe antérieur et le lobe intermédiaire est beaucoup plus floue que chez le Cobaye. Il semble même que des cellules en tous points semblables aux cellules corticotropes du lobe antérieur, existent dans le lobe intermédiaire.

3°) ACTH dans le lobe intermédiaire

La remarque qui précède souligne dans ce domaine aussi l'originalité du lobe intermédiaire du Lérot, dont il sera traité plus loin. Dans ce paragraphe, c'est essentiellement l'exemple du Cobaye qui sera discuté.

Nos résultats montrent dans cette espèce, une très nette fixation des anticorps anti-ACTH sur les cellules du lobe intermédiaire.

Le marquage anti-1-24ACTH pourrait tout simplement s'expliquer par une réaction croisée de l'anticorps avec l' α -MSH. En effet, d'une part cette molécule est certainement présente dans le lobe intermédiaire et d'autre part, sa séquence en acides aminés est formée par la chaîne 1-13 de l'ACTH modifiée uniquement à ses extrémités (voir fig. 13, p. 68). Cependant, la réaction croisée semble devoir être écartée puisque α -MSH est incapable d'inhiber le marquage anti-1-24ACTH (tableau II, p. 20). Il semble donc que la partie biologiquement active de la molécule d'ACTH puisse être réellement présente dans le lobe intermédiaire. Cette déduction rejoint les conclusions de travaux qui démontrent l'existence d'une activité ACTH dans le lobe intermédiaire (KRAICER et coll., 1971, 1973 ; KRAICER et DHARIWAL, 1974 ; KRAICER et MORRIS, 1976 a et b ; KRAICER, 1977 ; BERAUD, 1977), déjà suggérée par des données biochimiques et morphologiques. Cependant, bien que cette sécrétion puisse être influencée, *in vitro*, par le CRF hypothalamique (BRIAUD et coll., 1978), il semble que l'ACTH du lobe intermédiaire réponde à des stimulus nerveux alors que l'ACTH du lobe antérieur soit sous dépendance humorale (MORIARTY et MORIARTY, 1975 ; MORIARTY et coll., 1975 ; FISCHER et MORIARTY, 1977).

En admettant qu'elle existe, la corticotropine du lobe intermédiaire ne devrait pas être sous la forme qu'elle revêt dans le lobe antérieur. En effet, si les marquages anti-1-24ACTH et anti-17-39 ou 25-39ACTH sont rigoureusement comparables dans le lobe antérieur, ils diffèrent nettement dans le lobe intermédiaire. Cette divergence ne paraît pas être spécifique de l'hypophyse du Cobaye puisque des observations analogues avaient déjà été faites sur l'hypophyse du Rat, *in situ* ou en greffons intrahypothalamiques (DUBOIS, 1972 b ; DUBOIS, 1973). Au cours de cette dernière expérimentation, la fixation d'anticorps anti-1-24ACTH sur le lobe intermédiaire varie en fonction de la zone d'implantation du greffon dans l'hypothalamus, suggérant pour le lobe intermédiaire,

l'existence d'une sécrétion corticotrope dépendante de facteurs en provenance des centres nerveux supérieurs. De tels facteurs semblent également intervenir au cours de la différenciation de l'hypophyse foetale chez le Rat (DUPOUY et DUBOIS, 1975 ; CHATELAIN et coll., 1976, 1979).

L'utilisation du fixateur de Carnoy nous a aussi permis de montrer que l'élaboration de la corticotropine du lobe antérieur se distingue morphologiquement de celle du lobe intermédiaire. Ces différences concernant notamment la zone golgienne, sont certainement l'image de processus de synthèse particuliers à chacun des lobes. Ces observations rejoignent les résultats de travaux de morphologie classique faisant ressortir des différences très importantes entre les cellules du lobe intermédiaire alors considérées comme exclusivement mélanotropes (HOWE et MAXWELL, 1968) et les cellules corticotropes du lobe antérieur (SIPERSTEIN et ALLISON, 1965), ainsi que ceux de travaux immunohistochimiques (MORIARTY et HALMI, 1972 a ; MORIARTY, 1977).

La fixation sur le lobe intermédiaire des anticorps dirigés contre la portion COOH terminale de l'ACTH (anti-17-39ACTH et anti-25-39 ACTH) doit également être considérée à la lumière des travaux de l'équipe de SCOTT (1972, 1973, 1974 a et b) démontrant la présence dans le seul lobe intermédiaire, d'un peptide formé par la séquence 18-39 de l'ACTH. Cette découverte permit à ses auteurs d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'ACTH du lobe intermédiaire jouerait le rôle essentiel de précurseur pour deux peptides caractéristiques de ce lobe : l' α -MSH (= ACTH 1-13) et le "corticotropin-like intermediate lobe peptide" ou CLIP (= ACTH 18-39) (Fig. 13, p. 68). Ces deux peptides ont une existence réelle mais leur fonction périphérique en tant qu'hormones hypophysaires reste à démontrer chez les Mammifères. Ainsi, l'importance de l'activité mélanophorétique de l' α -MSH apparaît chez les Vertébrés inférieurs, mais mal chez les Vertébrés supérieurs. Chez les Mammifères, les actions d' α -MSH sur les glandes sébacées (THODY et SHUSTER, 1973) ou sur la croissance foetale (SWAAB et VISSER, 1977) ne paraissent pas être ses fonctions essentielles. Il en est de même de l'action stimulante du CLIP sur la sécrétion d'insuline (BELOFF-CHAIN et coll., 1977).

Quoi qu'il en soit des rôles respectifs de l' α -MSH et du CLIP, il n'en demeure pas moins que, chez le Cobaye, les analogies de répartition entre les marquages anti- α -MSH et anti-17-39ACTH du lobe intermédiaire, ne

s'opposent pas à l'hypothèse de SCOTT. Par contre, nos résultats sur l'hypophyse du Lérot paraissent la contredire. En effet, chez cet animal, les cellules responsables de la sécrétion d' α -MSH ne réagissent jamais aux immunosérums anti-ACTH alors que ces mêmes immunosérums marquent très nettement les cellules corticotropes réparties surtout dans le lobe antérieur, mais présentes également dans le lobe intermédiaire. La séquence de l'ACTH du Lérot n'est évidemment pas connue et on pourrait invoquer ses hypothétiques particularités chimiques. Cependant, comme l'antisérum dirigé contre le 17-39ACTH (humain) marque le type cellulaire révélé par l'anti-1-24ACTH (humain), il n'est pas douteux que la molécule réagissante soit bien l'ACTH du Lérot et qu'en outre, cette molécule soit proche de l'ACTH humain. Chez le Lérot, en conséquence, l' α -MSH et la portion COOH-terminale de l'ACTH n'étant jamais localisées dans la même cellule, leur origine commune due au clivage enzymatique de l'ACTH 1-39 est difficilement envisageable.

Dans le même ordre d'idées, l'étude *in vitro* des processus de synthèse protéique dans le lobe intermédiaire de la Souris montre que l'apparition d' α -MSH précède celle d'ACTH (JENKS et coll., 1979). Ce résultat conduit ses auteurs à discuter l'origine de l' α -MSH.

Donc, pour séduisante qu'elle soit, l'hypothèse proposant l'ACTH du lobe intermédiaire comme précurseur de l' α -MSH et du CLIP, ne semble pour le moins, pas devoir être généralisée à toutes les espèces de Mammifères.

La signification de la présence d'ACTH biologiquement et immunologiquement actif dans les cellules du lobe intermédiaire de nombreuses espèces demande donc pour être établie, d'autres investigations. On peut dès maintenant prévoir que la question devra être examinée en tenant compte du fait que l'ACTH est incorporé dans la molécule de pro-opiomélanocortine (RUBINSTEIN et coll., 1978 ; CHRETIEN et coll., 1979) dont le lobe intermédiaire semble être la source principale. Le problème du précurseur hypophysaire des hormones et substances polypeptidiques est abordé plus en détail dans la conclusion du Chapitre 2.

4°) β -mélanotropine immunoréactive

Les deux espèces étudiées ici sont différentes en ce qui concerne ce point particulier. La réaction anti- β -MSH est extrêmement nette chez le Lérot et totalement absente chez le Cobaye.

Chez le Léroto, le marquage anti- β -MSH caractérise à la fois les cellules à α -MSH situées dans le lobe intermédiaire et les cellules corticotropes. C'est le cas qui semble le plus répandu chez les Mammifères puisque dans toutes les espèces jusqu'ici étudiées la β -MSH immunoréactive est détectée dans le lobe intermédiaire et dans les cellules corticotropes (voir GIROD, 1976). Une possible réaction croisée entre β -MSH et ACTH ne peut être retenue comme interprétation de cette double localisation, et cela pour plusieurs raisons. La première est que l'absorption préalable de l'immunsérum par l'ACTH est sans effet sur le marquage. La deuxième est que chez le Léroto, une réaction anti- β -MSH est détectée dans les cellules à α -MSH, alors qu'aucune réaction anti-ACTH n'y est observée. Chez le Cobaye, enfin, aucun marquage anti- β -MSH n'est décelé alors que les marquages anti-ACTH sont toujours très nets.

Bien qu'elle ait surpris au premier abord, la présence concomitante de β -MSH et d'ACTH dans les mêmes cellules du lobe antérieur se montra en accord avec bon nombre de résultats. Chez l'Homme, les taux plasmatiques des deux hormones varient parallèlement en diverses circonstances telles que l'administration de glucocorticoïdes ou l'effondrement provoqué du cortisol endogène (ABE et coll., 1969). Par contre, après traitement par la dexaméthasone, les taux d'ACTH et β -MSH sont dissociés (KASTIN et coll., 1973). Si l'on tient compte du fait que les deux hormones sont non seulement présentes dans la même cellule, mais aussi dans le même grain de sécrétion (MORIARTY, 1973), l'interprétation de leur libération différentielle devient difficile sinon impossible dans l'état actuel des connaissances. D'autant plus que les processus de régulation par l'hypothalamus des sécrétions corticotrope et mélanotropes viennent s'ajouter par l'intermédiaire de facteurs dont l'existence a été démontrée mais dont la nature chimique reste à préciser.

A ce sujet, on peut remarquer que dans l'hypophyse le grain corticomélanotrope ne constitue pas un cas unique, puisque le grain de la cellule gonadotrope contient les deux hormones gonadotropes LH et FSH (HERBERT, 1976). La régulation par un unique facteur hypothalamique (LH-FSH-RH) de ces deux hormones aux taux plasmatiques souvent très divergents, demande également à être éclaircie.

Si l'on fait abstraction des problèmes de la sécrétion, la présence simultanée d'ACTH et β -MSH dans le même grain se conçoit beaucoup

mieux depuis la démonstration de l'existence d'un précurseur contenant les séquences de l'ACTH et de β -LPH (MAINS et coll., 1977 ; ROBERTS et HERBERT, 1977). Cependant, le fait que la séquence de la β -MSH soit en totalité incluse dans la molécule de la β -LPH (Fig. 14, p. 69) ajouté à son activité biologique modérée, permet d'émettre des réserves sur son existence en tant qu'entité peptidique. En effet, chez l'Homme, l'immunoréactivité anti- β -MSH dans l'hypophyse (SCOTT et LOWRY, 1974) et le plasma (GILKES et coll., 1975) semble plutôt due à la présence de β -LPH ou de γ -LPH. Des conclusions analogues ont été formulées plus récemment, basées sur l'utilisation d'un système chromatographique où l'immunoréactivité anti- β -MSH n'a été démontrée que dans le volume d'élution de β -LPH (BACHELOT et coll., 1976, 1977). Les auteurs concluent donc que, chez l'Homme, l'entité peptidique β -MSH n'existe pas. Il est possible que l'absence totale de fixation des anticorps anti- β -MSH sur l'hypophyse du Cobaye ait la même cause. Une deuxième éventualité serait qu'il n'existe pas de réaction croisée entre les anticorps anti- β -MSH bovine et la β -MSH de Cobaye. Dans ce cas, parmi les β -MSH de 13 espèces de Mammifères étudiées (voir GIROD, 1976) avec le même immunsérum, celle du Cobaye serait la seule à présenter cette particularité. Par ailleurs, si dans les autres espèces et spécialement chez l'Homme, la réaction anti- β -MSH devait s'expliquer par le marquage de la β -LPH ou de la γ -LPH, cela voudrait dire que le Cobaye ne possède pas ces hormones. En ce qui concerne au moins la β -LPH nos résultats infirment cette possibilité car les anticorps dirigés contre β -LPH totale, β -endorphine (= β -LPH 61-91) ou α -endorphine (= β -LPH 61-76) marquent les cellules corticotropes et le lobe intermédiaire. Par contre, la conclusion à l'absence de γ -LPH pourrait être exacte, car, chez le Cobaye, aucune fixation des anti- γ -LPH n'a été décelée.

La négativité des réactions anti- β -MSH et anti- β -LPH pourrait être aussi imputable à l'absence des peptides libres, elle-même due à l'absence de clivage entre les acides aminés 58 et 61 (Fig. 14, p. 69). Or, si la β -endorphine dérive, comme cela est probable, de la β -LPH, la coupure qui la produit devrait laisser accessible l'extrémité C-terminale commune à β -MSH et γ -LPH. Donc, si l'on admet l'existence de la β -endorphine, il faut pour interpréter l'absence de fixation des anti- β -MSH, imaginer un "masquage" de l'extrémité COOH ou une séquence en acides aminés différente de celle de la β -MSH bovine contre laquelle sont dirigés les anticorps. Quelle qu'en soit la cause, la négativité de la réaction anti- β -MSH singularise le Cobaye, parmi les espèces de Mammifères testées à cet égard.

5°) Localisation de l' α -mélanotropine

De toutes les réactions immunohistochimiques dirigées contre des fragments de l'ACTH ou contre les mélanotropines, celle qui caractérise le mieux le lobe intermédiaire est la réaction anti- α -MSH. La localisation de l' α -MSH dans le seul lobe intermédiaire se retrouve chez tous les Mammifères étudiés à cet égard (voir GIROD, 1976) et est particulièrement bien illustrée par l'exemple du Lérot. En effet, cet animal ne possède qu'un lobe intermédiaire extrêmement réduit et hétérogène, au point de vue de sa composition cellulaire puisqu'on peut y observer des cellules somatotropes. En dépit de son manque d'unité anatomique, seul ce lobe intermédiaire renferme les cellules marquées par les anti- α -MSH. Chez le Hamster doré, GIROD et DUBOIS (1974 a) rapportent que quelques cellules du lobe antérieur sont marquées par l'anti- α -MSH mais ces cellules sont toujours distribuées au voisinage immédiat du lobe intermédiaire et peuvent donc être considérées comme en faisant partie. Un problème plus particulier est posé par l'hypophyse de l'Homme adulte, entièrement dépourvue de lobe intermédiaire. L' α -MSH qui d'abord paraissait absente de l'hypophyse humaine (DIXON, 1960) devait y être finalement caractérisée (LEE et coll., 1961) puis dosée (ABE et coll., 1967). En immunohistochimie après avoir été localisée dans toutes les cellules corticotropes (PHIFER et coll., 1974), vraisemblablement en raison de l'utilisation d'un immunosérum non spécifique, cette hormone fut détectée sélectivement dans des cellules toujours situées en bordure du lobe postérieur et même incorporées à ce lobe (NIEUWENHUIJZEN-KRUSEMAN et SCHRODER-VAN DER ELST, 1976). Chez l'Homme, l' α -MSH ne fait donc pas exception à la règle puisqu'élaboré dans une zone de l'hypophyse qui peut être considérée comme un lobe intermédiaire anatomiquement mal délimité et paraissant être en étroite association avec le lobe nerveux. La présence exclusive d' α -MSH dans le lobe intermédiaire, lui-même attenant au lobe nerveux, pourrait être à rapprocher de l'innervation des cellules du lobe intermédiaire par des terminaisons, vraisemblablement en provenance de l'hypothalamus via le lobe nerveux, et contenant des granules aminergiques ou peptidergiques (BARGMANN et coll., 1967). Le rôle des catécholamines dans le contrôle de la mélanotropine est démontré (TALEISNIK et coll., 1972) et s'exercerait donc par l'intermédiaire de cette innervation.

Par ailleurs, la localisation exclusive de l' α -MSH dans le lobe intermédiaire concorde parfaitement avec la localisation dans cette

zone de l'essentiel de l'activité mélanotrope totale de l'hypophyse. En effet, la β -MSH qui, elle, est aussi bien présente dans le lobe intermédiaire que dans le lobe antérieur a été estimée 200 fois moins active que l' α -MSH, elle-même 600 fois plus active que l'ACTH (EVANS et coll., 1966).

6°) Marquage anti-4-10ACTH

Les résultats des tests de spécificité et en particulier l'absence d'inhibition des réactions anti-MSH par le 1-24ACTH et *vice versa*, tendent à démontrer que l'heptapeptide commun ne représente pas un site antigénique majeur et donc que les anticorps anti-MSH ou anti-ACTH ne le reconnaissent pas.

Les marquages donnés par l'immunsérum dirigé contre le seul fragment 4-10 de l'ACTH sont donc particulièrement intéressants. Il est d'abord important de noter que ni 1-24ACTH, ni α -MSH ne sont capables d'inhiber le marquage anti-4-10ACTH, ce qui revient à dire que l'heptapeptide présent dans chacune de ces 2 molécules n'est pas accessible à l'anticorps ou que la constante d'association est faible. Ce comportement *in vitro* de l'anticorps semble se reproduire sur coupes puisque, chez le Cobaye, comme chez le Lérot, toutes les cellules élaboratrices d'hormones polypeptidiques ne sont pas marquées alors que toutes contiennent forcément la séquence 4-10ACTH. Chez le Cobaye, le marquage anti-4-10ACTH intéresse exclusivement le lobe intermédiaire, de même que le marquage anti- α -MSH. Cependant, la comparaison cellule à cellule que permet la méthode des marquages successifs, montre que l'anticorps anti-4-10ACTH ne se fixe pas sur les sites α -MSH : une cellule peut, en effet, être fortement marquée par l'anti- α -MSH et faiblement ou pas du tout marquée par l'anti 4-10ACTH, ou inversement. Néanmoins, certains animaux ont des réactions anti- α -MSH et anti-4-10ACTH superposables, mais dans ce cas, le marquage anti-4-10ACTH demeure faible (Pl. XIV).

Chez le Lérot, le marquage anti-4-10ACTH n'intéresse qu'une partie des cellules corticomélanotropes du lobe intermédiaire et du lobe antérieur. Ces cellules élaborent donc un peptide contenant un site 4-10ACTH accessible aux anticorps. Cette accessibilité pourrait être liée au stade de synthèse du polypeptide ce qui implique que des cellules voisines présenteraient des états sécrétoires très différents. Cette interprétation paraît être valable pour l'hypophyse du Lérot mais non pour celle du Cobaye dans laquelle seules les

cellules du lobe intermédiaire réagissent à l'anti-4-10ACTH. Un marquage également limité au lobe intermédiaire s'observe chez les Bovins et le Rat (DUBOIS, communication personnelle). Dans ces espèces, il semble donc que l'anticorps se fixe sur un peptide bien particulier, souvent propre au lobe intermédiaire mais qui, dans la plupart des cas, ne paraît pas être l' α -MSH. Cette conclusion n'est pas incompatible avec l'existence d'une entité peptidique proche de la séquence 4-10 de l'ACTH, sinon exactement identique. Une telle existence est d'ailleurs suggérée par les effets spécifiques du peptide synthétique sur la calcémie, la phosphorémie et la lipémie (DROUHAULT et coll., 1975). Il a de plus été démontré que c'est essentiellement par sa séquence 4-10 que l'ACTH intervient dans les phénomènes de comportement, d'apprentissage et de mémorisation (DE WIED, 1976, 1977 ; voir BOHUS, 1979). Récemment, l'existence dans le lobe intermédiaire du Rat d'un peptide de poids moléculaire inférieur ou égal à 700 et à forte activité mélanotrope, a pu être démontrée (LOH et GAINER, 1977). Les auteurs signalent comme très plausible, l'hypothèse selon laquelle il s'agirait de l'heptapeptide 4-10ACTH lui-même.

A propos de l'immunoréactivité anti-4-10-ACTH, il faut souligner l'originalité du lobe intermédiaire dans le processus global de l'élaboration des polypeptides par l'adénohypophyse. L'inventaire des peptides qui y sont élaborés ne paraît pas encore terminé. En 1976, SCOTT et coll. en dénombrent déjà au moins sept indépendamment de peptides possédant un résidu tryptophane à l'extrémité NH_2 (HAKANSON et coll., 1972, 1980). Récemment, l'analyse séquentielle de l'ADN codant le précurseur de l'ACTH- β -LPH a permis de postuler l'existence d'une γ -mélanotropine dans le lobe intermédiaire des Bovins (NAKANISHI et coll., 1979). La connaissance des peptides de cette zone hypophysaire a également beaucoup progressé depuis la caractérisation des endorphines dont la question est abordée ci-après.

II - ENDORPHINES

A - ETAT DES CONNAISSANCES

Le terme "endorphines" désigne un ensemble de peptides possédant une activité biologique de type morphinique, c'est-à-dire que ces peptides sont capables, *in vivo* comme *in vitro* de reproduire les effets de la morphine et des substances opioïdes. Ces effets sont apparus comme étant la conséquence de la fixation de l'opioïde sur un récepteur spécifique du système nerveux (démonstration quasi-simultanée en 1973 par TERENIUS, PERT et SNYDER, SIMON et coll., WONG et HORNG). C'est donc leur capacité à se fixer sur ce récepteur qui est à l'origine de la caractérisation et de la dénomination (morphines endogènes) des endorphines. Cependant, mis à part leur effet morphinomimétique, donc analgésique, et en dépit des actions endocrines et comportementales dont elles font preuve, leur fonction physiologique n'apparaît pas clairement.

Chimiquement, les endorphines sont toutes apparentées à la β -lipotrophine (β -LPH). Ce polypeptide fut isolé à partir de l'adénohypophyse (LI, 1964 ; BIRK et LI, 1964) et en raison de sa forte activité sur la mobilisation des graisses, il reçut la qualification d'hormone lipotrope ou lipotropine. L'activité lipolytique n'est cependant pas une propriété spécifique de la β -LPH puisque, les polypeptides hypophysaires de la famille de l'ACTH, possèdent une telle activité, annexe semble-t-il (LEBOVITZ et ENGEL, 1965).

La β -LPH fut définitivement décrite comme une chaîne polypeptidique de 91 acides aminés (GRAF et LI, 1973) dont la séquence permit de constater que dans sa portion 41-58 elle reproduisait exactement la séquence complète de la β -MSH (LI et coll., 1965) et contenait donc également la séquence heptapeptidique 4-10 de l'ACTH (voir fig.14, p. 69). Un rôle précurseur de β -MSH fut donc suggéré pour la β -LPH, d'autant plus que le fragment naturel 1-58- β -LPH ($=\gamma$ -LPH) fut isolé de l'hypophyse du Mouton (CHRETIEN et LI, 1967).

Un intérêt grandissant pour la β -LPH se manifesta avec la caractérisation de deux pentapeptides présents dans le cerveau : les enképhalines (HUGHES, 1975 ; HUGHES et coll., 1975). En effet, la séquence de

l'un d'entre eux, la méthionine-enképhaline, se trouvait être la portion 61-65 de la β -LPH. Parallèlement, des peptides morphinomimétiques furent mis en évidence dans des extraits hypophysaires (TESCHEMACHER et coll., 1975 ; COX et coll., 1975). Les auteurs testèrent donc la fixation sur le récepteur morphinique de fragments COOH terminaux de la molécule de β -LPH, tout particulièrement celui qui commence par la séquence de la méthionine-enképhaline (= 61-65 β -LPH). La portion 61-91 de la β -LPH montra ainsi une forte activité morphinomimétique sur une préparation d'iléum de Cobaye (COX et coll., 1976 b). Simultanément, LI et CHUNG, (1976) rapportèrent l'isolement, à partir d'hypophyses de Chameau, d'un peptide de 31 acides aminés, possédant une importante action morphinomimétique et qu'ils dénommèrent β -endorphine. Plusieurs autres molécules commençant par la séquence 61-65 β -LPH et possédant des propriétés analogues purent être isolées : la γ -endorphine, portion 61-77 de la β -LPH (LING et coll., 1976), l' α -endorphine, portion 61-76 de la β -LPH (GUILLEMIN et coll., 1976) et la δ -endorphine, portion 61-87 de la β -LPH (GUILLEMIN et coll., 1977). Ces peptides furent extraits aussi bien de l'hypophyse que de l'hypothalamus (LING et GUILLEMIN, 1976 a). Synthétisés, leurs propriétés s'avérèrent comparables (LING et GUILLEMIN, 1976 b ; LING et coll., 1976 ; LI et coll., 1976).

Ces importantes découvertes suscitèrent des travaux tendant à déterminer l'origine cellulaire de la β -LPH et des endorphines apparentées. Des immunosérums produits à partir de β -LPH d'extraction, d'origine bovine, ovine ou porcine, furent utilisés pour localiser par immunohistochimie les cellules hypophysaires responsables de son élaboration. Différents travaux arrivèrent à la conclusion que la β -LPH était élaborée par les cellules corticotropes du lobe antérieur et par l'ensemble des cellules du lobe intermédiaire (DUBOIS, 1972 b ; DUBOIS et GRAF, 1973 ; DESSY et coll., 1973 ; MOON et coll., 1973 ; DESSY et HERLANT, 1974). De plus la présence simultanée de β -LPH et ACTH fut démontrée dans les mêmes granules de sécrétion (PELLETIER et coll., 1977). La fixation des anticorps anti- β -LPH sur d'autres types cellulaires que le type corticotrope (MOON et coll., 1973) fut reconnue comme étant due à une contamination de la β -LPH d'extraction utilisée lors de l'immunisation.

Plus récemment, les méthodes immunohistochimiques (BLOOM et coll., 1977 ; BEGEOT et coll., 1978 a et b ; WEBER et coll., 1978, 1979 ; MARTIN et coll., 1979) furent utilisées pour localiser les cellules responsables de la production des endorphines. Les antisérums dirigés contre l' α -endorphine

(BLOOM et coll., 1977 ; BEGEOT et coll., 1978 a et b) comme les anti- β -endorphine, marquent les cellules corticotropes et les cellules du lobe intermédiaire. Dans un travail réalisé en microscopie électronique, WEBER et coll. (1979) montrent en outre, que la β -endorphine est contenue dans les mêmes granules de sécrétion que l'ACTH.

A la lumière de résultats obtenus par des techniques d'immunoprécipitation et tendant à prouver l'existence d'un précurseur commun de l'ACTH et de la β -LPH (et de ses dérivés), la localisation de ces peptides dans les mêmes cellules hypophysaires se conçoit bien. Cependant leur présence simultanée dans un même granule, implique, si l'on s'en tient à la conception classique de la sécrétion protéique hypophysaire, leur libération simultanée lors de l'extrusion du granule. Se pose donc encore le problème de la régulation différentielle de la sécrétion des polypeptides hypophysaires, que nous avons déjà évoqué à propos de l'ACTH et de la β -MSH.

REMARQUE concernant les enképhalines :

En tant que morphines endogènes, les enképhalines répondent très bien à la définition des endorphines. Cependant, en raison de différences dans les taux d'enképhaline ou de β -endorphine relevés dans le tissu nerveux, les auteurs ont eu tendance à considérer les enképhalines comme des peptides d'origine nerveuse, à séparer des endorphines d'origine hypophysaire. En fait, bien que la distinction ne soit pas stricte de ce point de vue, il semble bien que par leur fonction, les enképhalines représentent un cas particulier dans la famille des endorphines. Dans ce travail, leur répartition adénohypophysaire est exposée à part : Chapitre 2, III.

B - RECHERCHES PERSONNELLES

1°) Répartition des cellules fixant les anti-endorphines

Ces cellules ont été recherchées par utilisation de trois immunsérums dirigés contre la β -endorphine et un immunsérum dirigé contre l' α -endorphine.

a) Chez le Cobaye

Qu'ils soient dirigés contre l' α ou la β -endorphine, les marquages obtenus sont équivalents.

Sur coupes adjacentes, la comparaison des résultats montre une répartition apparemment identique des cellules fixant soit l'anti- α -endorphine, soit l'anti- β -endorphine. Seules des variations générales de l'intensité de la réaction probablement liées au titre des immunsérums respectifs, peuvent s'observer selon les sérums.

L'ensemble des cellules du lobe intermédiaire est marqué avec quelques différences individuelles d'une cellule à l'autre (Pl. XVII). Dans le lobe antérieur également, des cellules réagissent et, d'après leurs caractères morphologiques et topographiques, il est possible d'affirmer qu'il s'agit au moins en partie, des cellules corticotropes.

Chez tous les animaux que nous avons étudiés, les réactions ont toujours été fortement positives et en général, le marquage de la cellule du lobe antérieur et celui de la cellule du lobe intermédiaire, sont comparables. Chez quelques animaux cependant, on peut observer une réaction plus intense du lobe intermédiaire, alors que chez d'autres, c'est le lobe antérieur qui réagit plus fortement. Dans ces conditions, ces différences ne peuvent être considérées que comme révélatrices d'un état sécrétoire transitoire de l'une ou l'autre des deux grandes zones de l'adénophypophyse. Elles montrent cependant que cet état sécrétoire peut être différent selon le lobe hypophysaire, ce qui est vraisemblablement le résultat de processus régulatoires séparés.

b) Chez le Lérot

Dans cette espèce aussi, les immunsérums anti- α -endorphine et anti- β -endorphine induisent des marquages comparables. Les cellules immunoréactives se répartissent dans le lobe antérieur et dans le lobe intermédiaire et présentent d'évidentes analogies avec les cellules corticomélanotropes déjà décrites. Des comparaisons destinées à connaître leur nature exacte sont exposées plus loin.

2°) Répartition des cellules fixant les anti-lipotropines

Des immunsérums dirigés soit contre la β -LPH soit contre la γ -LPH ont été mis à notre disposition par le Dr. DUBOIS. Nous les avons testés uniquement chez le Cobaye, sans entreprendre une étude approfondie. Nous faisons donc rapidement état des résultats.

a) Réactions anti- β -LPH porcine

Deux sérums provenant de lapins différents (sérums 4053 et 3995) marquent nettement le lobe intermédiaire, mais les marquages qu'ils provoquent sont modérés en comparaison de ceux qui sont obtenus avec les anti-17-39ACTH et anti-endorphines.

Des cellules réagissent également dans le lobe antérieur mais là encore, le marquage est faible. Le sérum 4053 donne cependant un marquage plus fort que celui du sérum 3995.

D'une façon générale, en dépit de l'utilisation des sérums à des concentrations importantes, l'immunoréactivité de l'hypophyse du Cobaye nous est apparue modérée, vis à vis d'immunsérums qui donnent de très bonnes réactions dans d'autres espèces (DUBOIS, 1972 b ; DUBOIS et coll., 1973 ; BEGEOT et coll., 1978 a et b).

b) Réactions anti- γ -LPH porcine

Des immunsérums anti- γ -(1-46) LPH et anti- γ -(1-58) LPH dont l'activité a été montrée sur l'hypophyse des Bovins, Ovins et Porcins (DUBOIS et GRAF, 1973 ; DUBOIS et coll., 1973), ont été utilisés. Aucun d'entre eux n'a donné de marquage, quels que soient leur concentration et les animaux étudiés.

3°) Comparaison des réactions anti-endorphines avec les réactions anti-ACTH et anti-MSH

a) Dans le lobe antérieur

Pour le Lérot, comme pour le Cobaye, les comparaisons entre réactions anti-endorphines d'une part et anti-17-39ACTH ou anti-1-24ACTH d'autre part, démontrent clairement que toutes les cellules corticotropes et seulement elles, contiennent une ou des substances apparentées aux endorphines (Pl. XVI).

De plus, dans une même cellule, l'identité dans la répartition cytoplasmique des marquages anti-ACTH et anti-endorphine, suggère une même localisation fine pour les deux peptides.

b) Dans le lobe intermédiaire

1 - Chez le Cobaye

Des comparaisons faites sur coupes adjacentes entre les réactions anti- α -endorphine, anti- β -endorphine et anti-17-39ACTH, montrent que pour une cellule donnée, l'intensité de marquage ne change pas avec l'anticorps : une cellule fortement marquée par un immunsérum l'est également par les deux autres (Pl. XVII). Cette observation révèle probablement la même localisation intracytoplasmique des sites antigéniques 17-39ACTH et endorphine.

2 - Chez le Léro

Par la méthode des marquages successifs, en comparant le marquage anti- α -MSH d'une part aux marquages anti-ACTH (17-39 ou 1-24) et d'autre part aux marquages anti-endorphines (α ou β) nous avons pu montrer que la substance fixant les anti-endorphines est présente dans les deux types cellulaires: celui qui élabore l' α -MSH et celui qui élabore l'ACTH (Pl. XVIII).

Qualitativement, le marquage anti-endorphine serait comparable au marquage anti- β -MSH. Cependant, une particularité remarquable du marquage anti- β -MSH est que les cellules à α -MSH sont beaucoup plus immunoréactives que les cellules à ACTH (Pl. XIII). Après réaction anti-endorphine, aucune différence dans l'intensité de marquage n'est observée entre les deux types cellulaires (Pl. XVIII).

C - DISCUSSION

Chez le Cobaye et le Léroto, nos résultats établissent nettement qu'une molécule apparentée aux endorphines est présente dans des cellules déjà reconnues pour leur sécrétion d'ACTH et de MSH.

Il n'est pas impossible que le marquage soit partiellement dû à une réaction croisée avec la β -LPH qui est chimiquement très proche. De plus, le test d'inhibition de la fluorescence montre que l'anti- β -endorphine peut se fixer sur la β -LPH (tableau II). Ce même test cependant, permet de montrer que la fixation de l' α -endorphine n'est au plus que partielle. Il n'est pas douteux, par ailleurs que les endorphines existent dans l'hypophyse des Bovins, Ovins, Chamélidés (voir III - A), et que plusieurs peptides capables de se fixer aux récepteurs aux opiacés sont présents en abondance dans l'hypophyse du Rat (COX et coll., 1976 a) alors que la β -LPH n'a pas d'activité morphinomimétique. L'ensemble de ces faits, suggère que les marquages adénohypophysaires obtenus dans les deux espèces de rongeurs étudiées ici, révèlent bien la présence d'endorphines et non pas seulement celle d'un précurseur tel que la β -LPH.

Nos comparaisons ont toujours montré que, chez le Cobaye, la distribution des endorphines se superposait exactement à celle du tronçon 17-39 de l'ACTH. Il en est ainsi, non seulement entre les cellules, mais aussi à l'intérieur du cytoplasme d'une même cellule. Cette dernière remarque cadre parfaitement avec les résultats de WEBER et coll. (1979) qui montrent que l'ACTH et la β -endorphine sont contenus dans le même grain de sécrétion. Cette démonstration faite dans les cellules du lobe antérieur est sans doute valable pour celles du lobe intermédiaire où nos observations montrent que les réactions anti-17-39ACTH et anti-endorphines sont remarquablement analogues.

A l'occasion de la détection de la présence des endorphines, l'originalité des cellules à α -MSH du Léroto apparaît encore une fois. Ces cellules, comme nous l'avons vu, ne contiennent pas d'ACTH. Cependant, comme les cellules corticotropes de la glande, elles sont capables de fixer les anti-endorphines. Ressemblant en cela aux cellules à ACTH, les cellules à α -MSH du Léroto paraissent donc élaborer une molécule précurseur très voisine de la β -LPH puisque les réactions anti- β -MSH et anti- β -endorphine les révèlent. Dans l'hypophyse du Léroto, la localisation différente des réactions anti-ACTH, d'une part

et anti- α -MSH d'autre part, montre que deux types cellulaires existent. D'un point de vue fonctionnel, la distinction entre ces deux catégories semble se limiter à cela, puisque l'une comme l'autre peuvent élaborer des séquences voisines de β -MSH et des endorphines.

Immunsérums	L E R O T		C O B A Y E	
	Cellules du LA fixant l'anti-ACTH	Cellules du LI fixant l'anti- α -MSH	Cellules du LA fixant l'anti-ACTH	Cellules du LI fixant l'anti- α -MSH
Anti-ACTH 1-24 et 17-39	+	-	+	+
Anti- α -MSH	-	+	-	+
Anti- β -MSH	+	+	-	-
Anti-endorphines α et β	+	+	+	+
Anti-4-10ACTH	+ ou -	+ ou -	-	+ ou -

TABLEAU IV : Résumé et comparaison des résultats des marquages anti-(ACTH, MSH et endorphines) dans l'hypophyse, chez le Lérot et le Cobaye.

Deux catégories sont définies selon leur topographie et leurs deux réactions immunohistochimiques les plus caractéristiques.

1 - Cellules du lobe antérieur (LA) fixant les anti-ACTH,

2 - Cellules du lobe intermédiaire (LI), fixant l'anti- α -MSH.

+ : réaction positive ; - : absence de réaction.

III - ENKEPHALINES

A - ETAT DES CONNAISSANCES

C'est l'existence d'un récepteur nerveux à la morphine (TERENIUS, 1973 ; SIMON et coll., 1973 ; PERT et SNYDER, 1973 ; WONG et HORNG, 1973) qui a suscité la recherche des substances nerveuses endogènes utilisant ce récepteur. Au moment de la découverte des enképhalines (HUGHES, 1975), la présence d'une ou de plusieurs substances morphinomimétiques était soupçonnée dans l'hypophyse (COX et coll., 1975 ; TESCHEMACHER et coll., 1975). Lorsqu'il apparut que la séquence de la méthionine enképhaline était identique au tronçon 61-65 de la β -LPH (HUGHES et coll., 1975), le concept selon lequel les enképhalines seraient les seules morphines endogènes issues du clivage de la β -LPH fut avancé. Par la suite, la β -endorphine principal peptide opioïde de l'hypophyse et commençant par la séquence de la méthionine enképhaline (Fig. 14, p. 69), s'avéra posséder une activité morphinomimétique supérieure à celle des enképhalines (GRAF et coll., 1976 ; BRADBURY et coll., 1977). Les enképhalines furent donc considérées plutôt comme des neurotransmetteurs à action brève parce que rapidement inactivées, alors que la β -endorphine, mieux protégée parce que plus longue, agirait plus longtemps (SIMANTOV et SNYDER, 1976). Cette notion tenait compte de l'origine de ces peptides. Si l'hypophyse était la principale source des endorphines, l'idée d'une origine exclusivement nerveuse pour les enképhalines était avancée. D'autant plus que ces dernières avaient été isolées à partir du cerveau et que l'une d'entre elles possédait un résidu leucine en position C-terminale, alors qu'aucun polypeptide hypophysaire comparable à la β -LPH n'avait été trouvé porteur de cette particularité.

La plupart des auteurs qui se sont intéressés à la localisation des enképhalines aussi bien par des méthodes radioimmunologiques (HONG et coll., 1977 ; HUGHES et coll., 1977 ; YANG et coll., 1977 ; GROS et coll., 1978), que par des méthodes immunohistochimiques (ELDE et coll., 1976 ; HOKFELT et coll., 1977 ; SIMANTOV et coll., 1977 ; WATSON et coll., 1977) ne mentionnent pas l'hypophyse dans leurs résultats. Cependant, des taux notables furent détectés par fluorimétrie et dosage par radiorécepteurs (RUBINSTEIN et coll., 1977), par radioimmunologie dans l'ensemble lobe intermédiaire-lobe nerveux mais également dans le lobe antérieur du Rat (ROSSIER et coll., 1977 ; MILLER et coll., 1978 ; DUKA et coll., 1978 ; KUMAR et coll., 1979). Dans l'hypophyse humaine

où le lobe intermédiaire est inexistant, le lobe antérieur contient la majeure partie de l'activité méthionine-enképhaline totale (GRAMSCH et coll., 1979). Les enképhalines sont donc bien présentes dans l'hypophyse glandulaire et il est possible que leur labilité ait pu être la cause des résultats rapportant leur absence ou leurs taux non significatifs (GOLDSTEIN et coll., 1977). De plus, le lobe intermédiaire paraît être la zone hypophysaire où leur concentration est la plus forte (DUKA et coll., 1978). Aucun des travaux mentionnés n'attribue de signification fonctionnelle précise aux enképhalines dosées dans l'adénophypophyse, exception faite toutefois de ceux de KUMAR et coll. (1979), qui suggèrent leur intervention dans le déroulement du cycle oestral chez le Rat.

B - RESULTATS

Des antisérums provenant de l'immunisation de cinq lapins différents, ont été utilisés. Les marquages qu'ils induisent, bien que proches les uns des autres, montrent certaines particularités que nous signalerons au fur et à mesure de l'exposé des résultats et que nous résumons dans le tableau V, p. 98.

1°) Chez le Cobaye

a) Microscopie photonique

Rappelons que ces recherches ont été conduites essentiellement sur coupes au cryostat, car, après inclusion en paraffine, seuls des résultats médiocres avaient été obtenus.

Déjà à faible grossissement (Pl. XIX, A), l'immuno-réactivité anti-enképhaline de l'hypophyse est remarquable car il apparaît que plusieurs types cellulaires sont concernés. Les marquages les plus nets sont obtenus avec l'anti-leucine-enképhaline.

Le lobe intermédiaire réagit dans son ensemble mais de façon modérée. Les cellules les plus réactives se situent dans le lobe antérieur et il est possible de voir que topographiquement le marquage intéresse les cellules gonadotropes dont l'aspect est caractéristique.

Lorsque la réaction est dirigée contre la méthionine-enképhaline, le marquage peut être inhibé par une préabsorption de l'immunsérum par une dose de 500 µg, soit de méthionine-enképhaline, soit de leucine-enképhaline pour 1 ml de sérum pur. Quand elle est dirigée contre la leucine-enképhaline, seule la préabsorption par la leucine-enképhaline parvient à inhiber le marquage.

Dans le but de déterminer avec précision les types cellulaires réagissant, nous avons largement utilisé notre méthode de marquages successifs.

La confrontation de la réaction anti-enképhaline avec la réaction anti-LH β (Pl. XIX, B et C) montre que les petites cellules les plus immunoréactives aux anti-enképhalines, sont les cellules gonadotropes. Les mêmes comparaisons effectuées en utilisant au cours du deuxième temps le sérum anti-TSH bovin montrent que les cellules thyrotropes sont également marquées par les anti-enképhalines. Cependant, le traitement chimique d'éluion se montre défavorable à la bonne conservation de la morphologie de la cellule à TSH si bien que les documents obtenus sont de très mauvaise qualité (Pl. XX, D).

Par les confrontations entre réactions anti-enképhalines et anti-17-39ACTH, l'immunoréactivité anti-enképhaline des cellules corticotropes est aussi démontrée (Pl. XX, E et F).

La comparaison avec la réaction donnée par l'anticorps anti-GH humain prouve par contre qu'aucune cellule somatotrope ne fixe les anti-enképhalines. Nous examinerons les marquages obtenus sur chacun des types cellulaires immunoréactifs.

1 - Cellules gonadotropes

De tous les immunosérums anti-enképhalines utilisés, c'est l'anti-leucine-enképhaline qui les marque le plus.

En ce qui concerne les comparaisons entre l'immunoréactivité de ces cellules vis-à-vis de LH β ou des enképhalines, il est à noter que la réaction anti-gonadotropine est toujours beaucoup plus intense. On peut cependant constater que toutes les cellules gonadotropes réagissent à l'anti-leucine-enképhaline, mais chez la plupart des animaux étudiés, un marquage plus intense des cellules situées dans la *pars tuberalis* et la zone rostrale du lobe antérieur est observé.

La répartition intracytoplasmique des marquages anti-gonadotropine et anti-enképhaline n'est pas totalement identique (Pl. XX, A et B), ce qui pourrait être dû à une répartition un peu différente pour chacun des deux antigènes, mais également à une altération des organites immunoréactifs, causée par le traitement d'éluion des anticorps.

Des quatre antisérums dirigés contre la méthionine-
enképhaline seul le M marque de façon liminaire les cellules gonadotropes.
Les trois autres (M1, 19638 et 19639) les marquent nettement (tableau V, p.98).

2 - Cellules thyrotropes

De grandes cellules polyédriques, situées essentiellement dans la zone d'émergence des gros vaisseaux-portes réagissent fortement à quatre des cinq immunsérums testés. La réaction obtenue avec le sérum M n'est que modérée (tableau V, p.98).

L'aspect typique et la localisation antéro-ventro-médiane de ces cellules évoquent bien les cellules à TSH (TRAMU, 1969). Effectivement par la méthode des marquages successifs, ces cellules sont reconnues comme thyrotropes, mais, comme nous l'avons déjà dit, le traitement d'éluion est particulièrement défavorable à la conservation morphologique des cellules thyrotropes qui se rétractent fortement (Pl. XX, C et D) alors que dans les mêmes conditions, les cellules gonadotropes ne subissent pas de dommages apparents (Pl. XX, A et B).

Toutes les comparaisons que nous avons effectuées montrent que pour les cellules à TSH plus que pour les cellules gonadotropes, la répartition du marquage anti-enképhaline n'est pas équivalente à celle du marquage anti-TSH. Certaines cellules à TSH fixent en effet beaucoup plus que d'autres, les anti-enképhalines, mais le marquage finement granulaire est toujours réparti de façon homogène dans le cytoplasme (Pl. XX, C).

3 - Cellules corticomélanotropes

Ce vocable regroupe les cellules corticotropes du lobe antérieur et l'ensemble des cellules du lobe intermédiaire. Tous les immunsérums anti-enképhalines les révèlent. En général, la réaction est modérée, comprise entre deux extrêmes : le marquage important induit par le sérum M et le marquage faible dû au sérum M1 (tableau V, p.98).

Des comparaisons des réactions anti-enképhalines et anti-17-39ACTH ont prouvé la nature corticotrope de certaines cellules marquées dans le lobe antérieur (Pl. XX, E et F).

Il faut remarquer que d'une façon générale, parmi les types cellulaires fixant les anti-enképhalines dans l'hypophyse du Cobaye, les cellules corticomélanotropes sont paradoxalement, les moins immunoréactives (Pl. XIX, A).

b) Microscopie électronique

La singularité des localisations hypophysaires de l'immunoréactivité anti-enképhaline nous a conduit à aborder le problème à l'échelle ultrastructurale.

En collaboration avec J.C. BEAUVILLAIN, une étude a été menée sur l'hypophyse du Cobaye, en s'appuyant sur deux méthodologies différentes. Dans l'une, la réaction immunocytochimique est pratiquée avant l'enrobage en araldite nécessaire à la confection des coupes ultrafines, alors que dans l'autre, la réaction est postérieure à l'enrobage (Chapitre 1, D, 2°), d).

1 - Méthode de marquage avant enrobage

En fonction des résultats de microscopie photonique, nous avons choisi, pour cette étude, d'employer surtout l'immunsérum anti-leucine-enképhaline. D'autres réactions ont été conduites avec le sérum M1. Les différences observées entre les marquages donnés par chacun des sérums confirment celles qui ont été constatées en microscopie photonique.

C'est essentiellement pour étudier la localisation ultrastructurale des enképhalines dans l'éminence médiane que cette méthode a été employée. C'est pourquoi seules les régions rostrales de l'antéhypophyse ont été examinées. Les cellules marquées qui s'y trouvent présentent les caractéristiques ultrastructurales des cellules gonadotropes (BEAUVILLAIN, 1978). Effectivement, la *pars tuberalis* et les régions hypophysaires jouxtant l'éminence

médiane sont riches en cellules gonadotropes (TRAMU et DUBOIS, 1972).

Dans les cellules individualisées, le marquage proprement dit est situé sur les grains de sécrétion qui réagissent selon différents degrés d'intensité (Pl. XXI). En plus de cette réaction granulaire nette, il existe un marquage cytoplasmique diffus qui peut parfois souligner les citernes ergastoplasmiques. Il faut cependant remarquer qu'en dehors des granules intacts, la conservation de la morphologie fine n'est que médiocre et que la réaction diffuse pourrait être due à la libération du contenu de certains grains de sécrétion. L'insuffisante préservation du tissu n'a pas rendu possible la reconnaissance précise de types cellulaires marqués, autres que le type gonadotrope.

2 - Méthode de marquage après enrobage

La mise en oeuvre des réactions sur les coupes ultra-fines, permet d'excellents marquages anti-enképhalines. Selon leurs caractéristiques morphologiques et topographiques, trois types cellulaires sont très nettement reconnus, mais remarquons immédiatement que dans les trois cas, seul un marquage granulaire a été noté.

α) Cellules gonadotropes

L'aspect caractéristique du marquage par le PAP s'observe sur la quasi-totalité des grains de sécrétion. Cependant, la densité en agrégats du complexe PAP est très variable d'un grain à l'autre (Pl. XXII, A). Dans certaines cellules, il est possible d'observer des granules entièrement dépourvus de marquage. En confirmation des résultats obtenus en microscopie photonique, les réactions les plus nettes de ce type cellulaire sont observées avec l'anti-leucine-enképhaline.

β) Cellules thyroïdiques (Pl. XXII, B)
.....

Dans ce type cellulaire, tous les grains d'une même cellule sont marqués et cela de façon homogène, c'est-à-dire, que, d'un grain à l'autre, la densité en agrégats du complexe PAP semble être comparable. Cependant, certaines cellules à TSH sont fortement immunoréactives alors que d'autres le sont moins, bien que topographiquement proches. Il semble même que quelques cellules thyroïdiques reconnues par leurs caractères ultrastructuraux, demeurent non réactives.

γ) Cellules corticomélanotiques
.....

Moins important que celui des deux types cellulaires précédents, leur marquage est tout de même net. Autant que l'on puisse en juger en microscopie électronique, la réaction intéresse l'ensemble des cellules de ce type. De plus, à l'intérieur d'une même cellule, tous les grains sont marqués (Pl. XXII, C).

2°) Chez le Rat

A l'époque où ces recherches ont été entreprises, nous ne disposions plus de Lérôts dans le laboratoire et, dans le but d'établir des comparaisons, avec les résultats obtenus chez le Cobaye, nous avons effectué une étude des réactions anti-encéphaliques sur l'hypophyse de cinq rats femelles, souche Wistar.

L'étude a été conduite uniquement à l'échelle de la microscopie photonique, sur coupes au cryostat.

Chez tous les animaux étudiés, les immunosérums révèlent l'ensemble des cellules du lobe intermédiaire et de grandes cellules dispersées dans le lobe antérieur. D'une manière générale la comparaison avec les résultats obtenus chez le Cobaye fait apparaître que les cinq immunosérums donnent des résultats beaucoup plus proches les uns des autres chez le Rat et que d'autre part, dans cette espèce, la réaction anti-encéphalique du lobe intermédiaire est plus forte (Pl. XXIII, A).

Pour déterminer avec certitude la nature des cellules immunoréactives du lobe antérieur, la méthode des marquages successifs a été employée.

La réactivité du lobe intermédiaire nous a d'abord conduit à comparer le marquage anti-enképhaline à une réaction anti-17-39ACTH.

Les résultats illustrés sur la planche XXIII, A et B, montrent qu'effectivement, les cellules corticotropes réagissent aux anticorps anti-enképhalines mais de façon modérée, surtout quand on compare leur marquage à celui des autres grandes cellules immunoréactives.

La comparaison des réactions, avec des marquages anti-gonadotropine montre qu'aucune cellule gonadotrope ne réagit aux anti-enképhalines.

En revanche, les comparaisons avec des réactions anti-TSH bovine prouvent à l'évidence (Pl. XXIII, C et D) que les grandes cellules fortement marquées par les anticorps anti-enképhalines sont les cellules thyrotropes qui réagissent dans leur ensemble.

Les immunosérums marquent qualitativement les mêmes cellules, mais l'intensité des réactions varie d'un sérum à l'autre. Les meilleurs marquages sont obtenus avec les sérums M1 et 19639 (tableau V, p.98).

REMARQUE : En bordure du lobe intermédiaire, une zone du lobe nerveux réagit nettement aux anti-enképhalines. Des fibres nodulaires y sont observées.

	COBAYE MALE FEMELLE			RAT FEMELLE		
	Lobe intermédiaire et cellules corticotropes	Cellules thyroïdiques	Cellules gonadotropes	Lobe intermédiaire et cellules corticotropes	Cellules thyroïdiques	Cellules gonadotropes
Anti-Met-Enk. Sérum 19638	+	+	+	+	+	-
Anti-Met-Enk Sérum 19639	+	+	+	++	++	-
Anti-Met-Enk Sérum M1	+	+	+	+	++	-
Anti-Met-Enk Sérum M	++	+	+	++	+	-
Anti-Leu-Enk Sérum L	+	+	++	+	+	-

TABLEAU V : Marquages anti-encéphalines sur l'adénohypophyse du Cobaye et du Rat.

- : absence de réaction ; + : réaction faible ; + : réaction nette ; ++ : réaction forte.



C - DISCUSSION

Les résultats qui viennent d'être exposés étaient très inattendus et de par leur originalité même, demandent à être discutés à la lumière d'un certain nombre de notions que nous nous efforcerons d'aborder dans un ordre logique.

1°) Spécificité des marquages

Ainsi que l'ont montré les tests, tous les immunosérums anti-enképhalines utilisés peuvent être considérés comme très spécifiques des enképhalines et ne présentent qu'une réaction croisée non significative avec les endorphines α et β pourtant très proches. Cependant, les sérums croisent partiellement avec l'enképhaline "hétérologue" tout particulièrement l'anti-leucine-enképhaline avec la méthionine-enképhaline. Dans ces conditions nos observations ne peuvent prétendre établir de distinction entre la localisation des deux pentapeptides, et sont considérées comme rapportant la présence de l'une ou l'autre des enképhalines, ou des deux simultanément.



Chez le Cobaye, l'immunoréactivité anti-enképhaline décelée dans les cellules élaborant les hormones glycoprotéiques (LH, FSH et TSH) présente un caractère insolite qui nous a conduit à envisager la possibilité d'une réaction croisée avec la sous-unité α commune à ces hormones. En fait, les immunosérums ne croisent ni avec LH ni avec FSH et ce résultat rend l'hypothèse peu plausible.

2°) Localisation intracellulaire du marquage

Les observations faites en microscopie électronique précisent celles de microscopie photonique et les deux méthodes utilisées prouvent que l'antigène est essentiellement localisé au niveau des granules de sécrétion des cellules. Il semble toutefois que pour le type gonadotrope au moins, tous les grains d'une même cellule n'ont pas le même degré de marquage ce qui est à rapprocher de l'observation effectuée en microscopie photonique montrant

que LH et enképhaline ont des répartitions cytoplasmiques non identiques. Nous avons déjà signalé que la réaction cytoplasmique diffuse observée dans la méthode du marquage avant enrobage devait être considérée en tenant compte de la conservation morphologique défectueuse des organites. Bien que le fait puisse avoir une signification fonctionnelle, on doit remarquer qu'il n'est obtenu que par cette méthode et que, d'autre part, des images analogues sont observées lorsque cette même méthode est utilisée pour localiser la gonadotropine (BEAUVILLAIN, 1978).

3°) Signification des enképhalines dans l'adénohypophyse

Pour ce qui est de l'interprétation de la présence d'enképhaline dans les grains de cellules hypophysaires, la première possibilité est que la glande représente un important site de synthèse. En dépit du fait que les enképhalines aient été isolées du tissu nerveux, aucun argument ne permet d'écarter cette hypothèse. La génèse extracellulaire de méthionine-enképhaline à partir de la β -endorphine a été, en effet, prouvée (AUSTEN et coll., 1977). Même la présence de leucine-enképhaline dans l'hypophyse, est envisageable, à partir d'un précurseur analogue à celui qui semble exister dans le cerveau chez l'Homme (COX et coll., 1979) et chez le Porc (KANGAWA et coll., 1979). Cette "big-leucine-enképhaline" encore appelée α -néo-endorphine paraît même être le plus actif des morphinomimétiques endogènes (KANGAWA et coll., 1979). Il est donc possible, sinon probable, que les marquages anti-enképhalines des cellules corticomélanotropes signalent un site d'élaboration du pentapeptide.

Cependant, on comprend mal pourquoi l'enképhaline serait aussi élaborée par deux autres types cellulaires qui, par ailleurs, sécrètent des hormones chimiquement et biologiquement différentes des peptides morphinomimétiques. De plus, si l'on admet que l'intensité du marquage est proportionnelle à l'importance de la synthèse, il faudrait admettre que les enképhalines sont élaborées plus intensément dans les cellules sécrétant LH, FSH et TSH que dans les cellules élaborant les hormones de la famille d'ACTH/ β -endorphine.

Pour justifier le marquage anti-enképhaline des cellules gonadotropes et thyroïdiques, il paraît donc nécessaire d'envisager des hypothèses autres que la synthèse.

Des résultats, qui présentent certaines analogies avec les nôtres rapportent la présence du décapeptide LH-RH dans les grains de sécrétion des cellules gonadotropes (STERNBERGER et PETRALI, 1975 ; STERNBERGER et coll., 1978). Les auteurs suggèrent et argumentent la thèse selon laquelle le marquage est dû à la fixation du facteur hypothalamique sur son récepteur spécifique situé sur la cellule-cible effectrice. De même, pour le marquage des grains des cellules du lobe intermédiaire par l'anti-vasopressine, une explication analogue a été proposée (CASTEL, 1978). Certes, la vasopressine n'est pas comme le LH-RH, considérée comme une hormone hypothalamique à action hypophysiotrope, mais son intervention dans la commande de la sécrétion corticotrope est maintenant bien démontrée (Voir SAFFRAN et SCHALLY, 1977).

Le TRH (thyrotropin releasing hormone) fournit un autre exemple de localisation de neuropeptide hormonal d'origine hypothalamique, dans le cytoplasme de cellules hypophysaires. En effet, des cellules du clone GH3 élaborant de la prolactine sont capables d'incorporer le TRH tritié qui est alors retrouvé dans des fractions subcellulaires (GOURDJI et coll., 1973 ; BRUNET et coll., 1974) et dans le noyau (BOURNAUD et coll., 1977). *In vivo*, CHILDS et coll. (1978) rapportent l'immunoréactivité anti-TRH des grains des cellules thyrotropes, gonadotropes et à prolactine. Ces auteurs ne rejettent pas l'hypothèse d'une pénétration du TRH dans la cellule, mais avancent également la possibilité sans toutefois l'interpréter, de son origine endogène.

Ces exemples montrent donc, que des peptides hypothalamiques à action hypophysiotrope sont présents, en quantité détectable par immunohistochimie, dans (ou sur) les grains de cellules hypophysaires cibles.

Les enképhalines, de par leur localisation dans des terminaisons nerveuses de l'éminence médiane et leurs effets modulants sur les sécrétions hormonales de l'adénohypophyse ont les caractéristiques de neuro-peptides hypophysiotropes.

4°) Enképhalines et sécrétions hypophysaires

Comparables, en cela aussi, à la morphine connue pour ses effets endocrines (voir FISHMAN, 1978), elles sont capables de moduler toutes les grandes sécrétions pituitaires (voir FREDERICKSON, 1977 et aussi BEAUMONT et HUGHES, 1979). La naloxone, substance antagoniste spécifique des opiacés, abolissant les réponses hypophysaires aux enképhalines, l'intervention du récepteur morphinique dans leur mécanisme d'action est probable (MEITES et coll., 1979). L'action stimulante des enképhalines sur les fonctions somatotrope et prolactinique a été particulièrement étudiée. Il semble qu'elles agissent sur la GH hypophysaire au niveau hypothalamique (BRUNI et coll., 1977 ; COCCHI et coll., 1977 ; SHAAR et coll., 1977). En ce qui concerne l'augmentation importante des taux sanguins de prolactine qu'elles provoquent, les avis sont plus partagés : le site hypothalamique est encore invoqué (BRUNI et coll., 1977 ; COCCHI et coll., 1977 ; SHAAR et coll., 1977 ; VAN VUGT et coll., 1979) mais l'action directe sur l'hypophyse est elle aussi envisagée (LIEN et coll., 1976 ; MITTLER et coll., 1978 ; MAY et coll., 1979 a ; ENJALBERT et coll., 1979). L'action directe de l'enképhaline sur la cellule thyrotrope a été également avancée par MAY et coll. (1979 b) pour expliquer son effet freinateur sur la fonction TSH (BRUNI et coll., 1977).

Les investigations concernant l'action des enképhalines sur les fonctions gonadotropes hypophysaires sont encore peu nombreuses. BRUNI et coll. (1977) ainsi que MEITES et coll. (1979) rapportent un effet inhibiteur sur LH et FSH de la méthionine-enképhaline alors que, pour MAY et coll. (1979 a) la leucine-enképhaline a une action stimulante sur LH, action qui s'exerce directement sur la cellule gonadotrope. La méthionine-enképhaline semble également agir au niveau hypothalamique sur la sécrétion de LH-RH (ROTSZTEJN et coll., 1978). Cette action modulatrice que paraissent exercer les enképhalines sur les fonctions gonadotropes est en accord avec l'intervention des peptides morphinomimétiques sur ces mêmes fonctions (CICERO et coll., 1979) au cours de la maturation sexuelle. La part qui revient aux enképhalines et celle qui revient aux endorphines n'ont toutefois pas pu être précisées (BLANK et coll., 1979).

Les effets hypophysiotropes des enképhalines sont donc extrêmement variés et peuvent s'exercer aux niveaux hypothalamique ou hypophysaire.

5°) Cellules hypophysaires réagissant aux anti-enképhalines

Dans cette discussion, le cas des cellules cortico-mélanotropes sera volontairement considéré à part. Seul le marquage des cellules dont la sécrétion hormonale n'est pas apparentée aux enképhalines sera examiné, dans l'hypothèse d'une mise en évidence de sites cellulaires récepteurs d'un peptide modulateur.

Nous venons de voir que les enképhalines ont des effets importants sur les sécrétions de GH, prolactine, LH, FSH et TSH de l'hypophyse et que, vraisemblablement, ces effets sont dus à leur fonction physiologique. Or, nos résultats ne mentionnent pas de réactions anti-enképhalines sur les cellules à GH ou sur les cellules à prolactine. Etant donné les difficultés de reconnaissance chez le Cobaye du type cellulaire élaborant la prolactine, il n'est pas impossible que son marquage ait pu échapper à nos investigations. Chez le Rat cependant, ces cellules ne présentent aucune réaction anti-enképhaline. Pour ce qui est des cellules à GH de l'une ou l'autre espèce aucun doute n'est possible quant à leur non réactivité. Dans le cadre de notre hypothèse, l'action des enképhalines sur la prolactine et GH ne s'exercerait pas sur la cellule hypophysaire.

Des conclusions analogues ont été tirées de résultats obtenus par d'autres méthodes (BRUNI et coll., 1977 ; COCCHI et coll., 1977 ; SHAAR et coll., 1977 ; VAN VUGT et coll., 1979). Nos propres résultats concernant la présence d'enképhaline, dans les terminaisons somatostatinerigiques de l'éminence médiane paraissent complémentaires. Ils suggèrent en effet que l'intervention du pentapeptide dans la sécrétion de GH, pourrait se faire par l'intermédiaire du facteur inhibiteur de cette sécrétion rendant donc non indispensable l'action directe sur l'hypophyse (voir chapitre 3, II). Un mécanisme équivalent peut également être envisagé pour interpréter l'effet stimulateur que les enképhalines exercent sur la fonction prolactinique, à savoir qu'elles inhiberaient un facteur lui-même inhibiteur de cette fonction.

La dopamine pourrait être ce facteur puisque, d'une part elle possède un important effet PIF (prolactin-inhibiting factor) (voir MEITES, 1974), et d'autre part, elle est présente dans l'éminence médiane, essentiellement dans des terminaisons péricapillaires. C'est en effet dans de telles

terminaisons que se localise la réaction d'histofluorescence caractéristique des monoamines (BARRY et LEONARDELLI, 1968 ; BJORKLUND et coll., 1970).

L'existence de récepteurs spécifiques des enképhalines sur les terminaisons dopaminergiques n'a été pour le moment, démontrée que dans le striatum (POLLARD et coll., 1977, 1978), mais il n'est pas impossible que dans l'éminence médiane, il en aille de même. A propos du striatum, les auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle "la fonction majeure des enképhalines pourrait être de réaliser des inhibitions présynaptiques sur des systèmes neuronaux variés du système nerveux central".

En ce qui concerne, maintenant le marquage par les anti-enképhalines, des cellules élaborant les hormones glycoprotéiques LH, FSH et TSH, il témoignerait, selon notre hypothèse, d'une intervention directe des enképhalines sur les cellules thyroïdiques et, dans le cas du Cobaye, sur les cellules gonadotropes également. L'absence de réaction sur les cellules gonadotropes du Rat chez les animaux que nous avons utilisés serait peut-être à reconsidérer. En effet, dans cette espèce le taux d'enképhalines présentes dans le lobe antérieur subit de très importantes fluctuations au cours du cycle oestral (KUMAR et coll., 1979). D'autre part, l'action des peptides opioïdes sur la fonction LH est contingente de l'âge et du sexe (BLANK et coll., 1979), ce qui suppose que leur présence dans l'hypophyse pourrait être très variable.

Dans ce paragraphe consacré à la localisation hypophysaire des enképhalines, nous devons signaler que nos résultats rapportant le marquage des cellules thyroïdiques, gonadotropes et corticotropes, sont en opposition totale avec ceux d'un travail récent montrant que seules les cellules somatotropes présentent une réaction anti-méthionine-enképhaline (WEBER et coll., 1978 c). Ce résultat obtenu chez le Rat, contredit nos observations dans la même espèce, mais également celles de ROSSIER et coll. (1979) qui signalent comme nous-même, une réaction anti-enképhaline sur le lobe intermédiaire et certaines cellules du lobe antérieur sur la nature desquelles ils ne se prononcent pas. La discordance entre l'observation de WEBER et coll. (1978 c) et les nôtres est pour le moment ininterprétable, mais il paraît important de souligner que ces auteurs n'ont utilisé qu'un immunosérum. Nous avons, au contraire, employé des immunosérums provenant des saignées successives de cinq lapins différents. Nous avons noté, entre les marquages induits par ces immunosérums, de légères différences d'ordre quantitatif, mais dans leur ensemble, les résultats semblent constants et cohérents (tableau V, p. 98).

6°) Localisation granulaire des enképhalines

Si les marquages observés sur les cellules gonadotropes et thyroïdotropes sont bien en relation avec l'existence de sites récepteurs aux enképhalines, leur localisation granulaire semble, une fois de plus, paradoxale.

La situation intracellulaire de l'enképhaline n'est pas en elle-même étonnante car s'il est admis que la liaison entre le polypeptide et son récepteur se fait sur la membrane plasmique, plusieurs exemples montrent que la fixation peut être suivie d'endocytose. De tels processus ont été démontrés pour l'insuline, la gonadotropine chorionique, la LDL (low density lipoprotein), précurseur du cholestérol membranaire (voir BROWN et GOLDSTEIN, 1979), mais également pour le facteur hypothalamique LH-RH. En effet, HOPKINS et GREGORY (1977) démontrent que le LH-RH marqué par la ferritine pénètre dans la cellule gonadotrope et se distribue dans l'appareil de Golgi. D'une manière générale, le processus commence par le rassemblement de plusieurs complexes récepteur-hormone qui sont "internalisés" par l'intermédiaire d'une "coated vesicle". Le devenir du peptide internalisé est incertain et seules des suppositions peuvent être émises quant à son éventuelle dégradation.

Si l'enképhaline présente dans le grain gonadotrope, provient d'une endocytose, il faut supposer que le peptide puisse être incorporé au grain, à un moment ou à un autre de la genèse de ce dernier, par exemple dans l'appareil de Golgi. Effectivement, des rapports étroits ont été notés entre "coated vesicles", récepteurs internalisés et saccules golgiens (voir GOLDSTEIN et coll., 1979), et comme nous l'avons déjà signalé, le LH-RH internalisé gagne la zone golgienne (HOPKINS et GREGORY, 1977). JOSEFSBERG et coll. (1979) rapportent aussi la présence d'insuline combinée à son récepteur dans l'appareil de Golgi d'hépatocytes. Une autre équipe démontre même sur des cellules d'un mélanome en culture, que la β -MSH, après fixation sur son récepteur membranaire et internalisation, peut être suivie jusqu'au Golgi où elle est incorporée aux mélanosomes (VARGA et coll., 1976 ; MOELLMANN et coll., 1978).

Si l'on envisage la question sous cet angle, la présence d'enképhaline dans le grain d'une cellule dont elle influence la sécrétion, pourrait se concevoir, mais d'autres méthodes devront être mises en oeuvre pour juger de cette possibilité et déterminer comment le peptide module la libération du grain de sécrétion.

IV - C O N C L U S I O N S

Une catégorie cellulaire constituée par les cellules du type corticotrope dans le lobe antérieur et par les cellules du lobe intermédiaire, est responsable de l'élaboration d'une famille de substances protéiques à vocation hormonale. Ces substances sont toutes caractérisées par une chaîne peptidique simple et assez courte, dépourvue de cystéine. Dans cet ensemble, les enképhalines constituent un cas un peu particulier qui vient d'être longuement discuté. Dans ces conclusions, nous ne tiendrons compte que de la méthionine-enképhaline dans la mesure où sa synthèse par les cellules à ACTH/ β -LPH, est envisageable.

Le fait que des substances chimiquement proches et possédant des actions biologiques variées, soient élaborées par une même cellule, évoque bien l'existence d'un précurseur commun. Bien avant que des relations entre l'ACTH et la β -LPH aient été démontrées, des formes moléculaires de taille plus ou moins grande mais possédant une activité ACTH nette, étaient mises en évidence chez l'Homme (YALOW et BERSON, 1971) : les "big", "intermediate" and "little"ACTH dont l'existence fut confirmée chez le Crapaud (ESTIVARIZ et ITURRIZA, 1975) et le Rat (ESTIVARIZ et ITURRIZA, 1975 ; ZIMMERMAN et KRAICER, 1978). Chez l'Homme, ORTH et NICHOLSON (1977) montrent que le big ACTH et peut-être la forme intermédiaire également, sont des glycoprotéines.

Dans ces conditions, on comprend le caractère PAS positif des grains de sécrétion des cellules corticotropes, tout particulièrement intense dans certaines espèces telles que le Lérot.

Par ailleurs, lorsque LI et coll. (1965) établirent que la séquence 41-58 de la β -LPH était identique à la β -MSH, la β -LPH au rôle, jusque là énigmatique, fut regardée comme un précurseur possible de β -MSH mais aussi d'autres peptides alors non caractérisés. Récemment, plusieurs travaux effectués par des équipes différentes ont démontré l'existence d'un précurseur commun à la corticotropine et la β -lipotropine aussi bien dans des cellules tumorales d'hypophyse de Souris (MAINS et coll., 1977 ; ROBERTS et HERBERT, 1977 a et b) que dans l'hypophyse normale du Rat (RUBINSTEIN et coll., 1978). Etant donné que ce précurseur pouvait engendrer l'ACTH et les peptides opioïdes le

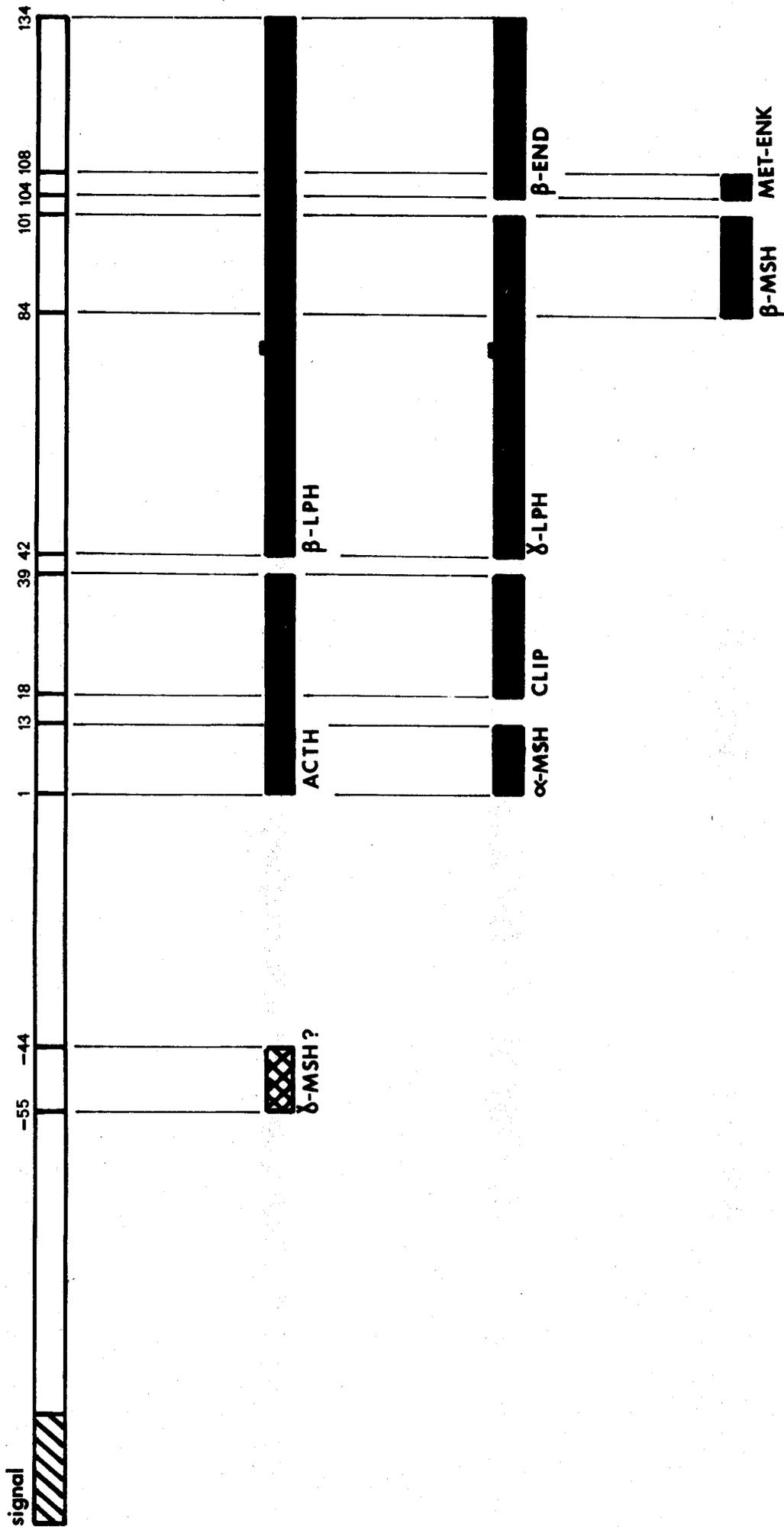


FIGURE 15 : Diagramme représentant le précurseur polypeptidique de l'ACTH et de β -LPH et les séquences engendrées par le clivage enzymatique de cette molécule.

D'après NAKANISHI et coll. (1979).

nom de pro-opiocortine lui fut attribué par les derniers auteurs.

Par l'analyse de la séquence nucléotidique de l'ADN codant ce précurseur chez les Bovins, ces résultats furent confirmés et même précisés puisque la séquence en aminoacides, proposée pour le fragment NH₂ terminal permit aux auteurs de prévoir l'existence d'une γ -MSH (NAKANISHI et coll. , 1979 ; fig. 15).

Ce travail reçut dernièrement une confirmation concernant une partie de la séquence de 130 aminoacides précédant celle de la supposée γ -MSH (HAKANSON et coll., 1980).

Le précurseur se présente apparemment sous plusieurs formes de poids moléculaires avoisinant respectivement 29000, 32000 ou 34000, qui existent aussi bien dans l'hypophyse tumorale que dans l'hypophyse normale (ROBERTS et coll., 1978). Cependant, le squelette peptidique de ces molécules est identique et seules leurs composantes glucidiques diffèrent. En outre les mêmes formes du précurseur semblent exister dans les deux lobes de l'adénohypophyse mais la distribution des fragments de taille inférieure varie entre lobe antérieur et lobe intermédiaire (ROBERTS et coll., 1978). Contrairement à ce qui se passe dans le lobe antérieur, l'ACTH 1-39 n'est pas un produit majeur de maturation dans le lobe intermédiaire, comme le sont α -MSH et β -endorphine (MAINS et EIPPER, 1979). Dans un même ordre d'idée, la β -LPH est caractérisée en tant que forme intermédiaire, alors que la β -endorphine est une forme mature (CHRETIEN et coll., 1979). Tous ces résultats obtenus par des méthodes biochimiques qui utilisent ou non l'immunologie, mettent l'accent sur les différences au total modérées existant entre les sécrétions des cellules corticotropes du lobe antérieur et celles du lobe intermédiaire, concordant en cela avec les résultats fournis par l'immunohistochimie. La molécule synthétisée est identique mais son clivage enzymatique se fait différemment selon le lobe de l'adénohypophyse.

Les sites cellulaires de l'immunoréactivité cadrent également bien avec l'hypothèse du précurseur. En effet, d'une manière générale et quel que soit l'antigène recherché, l'immunoréaction n'est certaine que sur les grains de sécrétion. Certes, une réaction diffuse dans le cytoplasme a pu être notée par plusieurs auteurs (NAKANE, 1970 ; TIXIER-VIDAL et coll., 1976 ; BEAUVILLAIN, 1978 ; TRAMU et BEAUVILLAIN, 1979), mais ce résultat est toujours observé après emploi de méthodes qui ne permettent pas toujours une bonne conservation des membranes granulaires. Pour la plupart, les travaux tendant à localiser l'ACTH ou la MSH, notent l'absence de marquage des systèmes intervenant

dans la synthèse protéique tels que l'ergastoplasme et l'appareil de Golgi. Cependant, un marquage anti-ACTH de granules en voie de formation dans les saccules golgiens a été rapporté par MORIARTY et HALMI (1972 b). WEBER et coll. (1978 a) démontrent même que dans la zone golgienne, certains grains sécrétoires et vésicules peuvent demeurer non immunoréactifs alors que des grains voisins sont bien marqués. Dans les cellules corticotropes, il semble donc que pour les organites cellulaires qui interviennent dans la synthèse protéique avant la formation du granule de sécrétion, le marquage soit nul ou au plus aléatoire. L'immunoréactivité commence à apparaître dans l'appareil de Golgi, évoquant bien un processus de maturation d'un produit de sécrétion. Dans une discussion précédente (Ch. 2, I, C, 1°) nous avons évoqué la faible affinité que paraît avoir l'anticorps pour l'antigène lorsque celui-ci est un tronçon peptidique incorporé dans une plus grande molécule. Cependant, il a aussi été démontré que des anticorps tels que l'anti-ACTH et l'anti- β -endorphine ont une très bonne affinité pour le précurseur ACTH/ β -endorphine. Cette réaction est en effet la base de la technique d'immunoprécipitation qui a permis la mise en évidence de ce précurseur (MAINS et coll., 1977). Si on les compare à cette méthode, les techniques immunohistochimiques en diffèrent fondamentalement par le fait que la réaction antigène-anticorps s'effectue sur tissu ayant subi un traitement chimique de fixation. Ce traitement provoque certainement le pontage des glycoprotéines du précurseur par leur partie glucidique, pontage qui pourrait être responsable du masquage partiel ou même total, de l'immunoréactivité.

Quoi qu'il en soit, la détection des "produits finis" n'est réalisable que dans le grain de sécrétion qui contient par conséquent plusieurs substances aux actions biologiques différentes. Le fait a été démontré clairement pour ACTH/ β -LPH (PELLETIER et coll., 1977) et pour ACTH/ β -endorphine (WEBER et coll., 1978 b, 1979) et il est probable qu'il en soit de même pour α -MSH/ β -endorphine dans les cellules du lobe intermédiaire. Se pose donc la question de la cession simultanée de plusieurs hormones au cours de l'exocytose, seul mode de libération du grain de sécrétion hypophysaire, établi pour le moment. Effectivement, des résultats expérimentaux montrent que l'ACTH, la β -LPH et β -endorphine sont libérés de façon concomitante, *in vivo* (GUILLEMIN et coll., 1977 ; KRIEGER et coll., 1977) aussi bien qu'*in vitro* (ALLEN et coll., 1978). Cependant, il a aussi été démontré que les taux d'ACTH et β -MSH sont dissociés après administration de dexaméthasone (KASTIN et coll., 1973). La connaissance du ou des facteurs hypothalamiques modulateurs de ces sécrétions fera certainement progresser la compréhension globale du phénomène et aussi celle du rôle

et de la fonction des polypeptides hypophysaires pour lesquels les informations dont nous disposons paraissent encore très incomplètes.

CHAPITRE 3

POLYPEPTIDES APPARENTES A L'ACTH
ET A LA β -LPH DANS L'HYPOTHALAMUS

I - CORTICOTROPINE, MELANOTROPINES
et ENDORPHINES.

A - ETAT DES CONNAISSANCES

Le problème de la présence de corticotropine dans le cerveau est relativement ancien, puisque c'est en 1962 qu'une substance apparentée à l'ACTH était détectée dans l'hypothalamus, chez le porc (GUILLEMIN et coll., 1962) et le Chien (SCHALLY et coll., 1962) et cela, en l'absence de contamination par du tissu hypophysaire. Ces résultats n'éveillèrent aucun écho notable, et ce n'est que récemment qu'ils reçurent confirmation. En effet, par dosages radioimmunologiques, une molécule apparentée à la portion NH₂-terminale de l'ACTH fut localisée chez le Rat, dans l'hypothalamus médiobasal (KRIEGER et coll., 1977 a), et le système limbique (KRIEGER et coll., 1977 b). A la même époque, nous avons montré (TRAMU et coll., 1977) qu'une substance capable de fixer les anticorps anti-17-39ACTH était présente dans le système de neurones connu pour élaborer la gonadolibérine LH-RH. La caractérisation du système à LH-RH avait été faite pour la première fois chez le Cobaye, terminaisons nerveuses dans l'éminence médiane (LEONARDELLI et coll., 1973), corps cellulaires dans l'hypothalamus antérieur (BARRY et coll., 1973 a et b). La substance apparentée à l'ACTH que nous avons détectée dans les neurones à LH-RH, est présente dans le péricaryon, l'axone et les terminaisons.

D'autres résultats permirent à leurs auteurs de conclure à la présence d'ACTH dans l'hypothalamus basal du Rat, grâce à des réactions immunohistochimiques dirigées contre la portion COOH-terminale (LARSSON, 1977 et 1978 ; TOUBEAU, 1978) ou NH₂-terminale (WATSON et coll., 1978). De plus, des substances polypeptidiques hypophysaires autres que la corticotropine furent également détectées dans le cerveau.

En effet, l' α -MSH y fut localisée dans la fraction synaptosomale (BARNEA et coll., 1977), puis dosée chez la Grenouille (VAUDRY et coll., 1978 a) et le Rat (VAUDRY et coll., 1978 b ; OLIVER et PORTER, 1978). Une immunoréactivité anti- α -MSH fut également montrée dans des terminaisons

nerveuses (PELLETIER et DUBE, 1977) puis d'une façon plus générale dans des corps cellulaires et des axones (SWAAB et FISSER, 1977 ; SWAAB et VISSER, 1977 ; JACOBOWITZ et O'DONOHUE, 1978).

Des travaux équivalents démontrèrent la présence de β -LPH dans l'hypothalamus, par des méthodes radioimmunologiques (KRIEGER et coll., 1977, c et d) ou immunohistochimiques (WATSON et coll., 1977 b ; ZIMMERMAN et coll., 1978).

La β -endorphine et l' α -endorphine furent elles aussi, détectées dans le cerveau avec des méthodes basées sur le dosage (LING et coll., 1976) ou sur la morphologie (BLOOM et coll., 1978 ; FOLLENIUS et DUBOIS, 1977 et 1978 ; BLOCH et coll., 1978 c).

En eux-mêmes, ces résultats étaient très intéressants mais, ils le devinrent plus quand il fut démontré, chez l'Homme, que des neurones du noyau infundibulaire contenaient simultanément β -LPH, α et β MSH, ACTH, α et β endorphines (BLOCH et coll., 1978 a et b ; BUGNON et coll., 1979 a et b). Ces résultats furent très vite confirmés chez le Rat (SOFRONIEW, 1979 ; BLOCH et coll., 1979) et la Brebis (NILAVER et coll., 1979).

Il apparaît donc que des neurones de l'hypothalamus basal renferment dans leur cytoplasme une ou plusieurs substances où l'on retrouve tous les déterminants antigéniques présents dans le produit de sécrétion de la cellule du lobe intermédiaire de l'hypophyse. Dès lors, deux questions se posent :

- 1/ celle de l'origine de ces polypeptides neuronaux : synthèse dans le péricaryon ou origine hypophysaire ?
- 2/ celle de leur signification fonctionnelle.

B - RESULTATS (tableau VI)

Les observations concernant la présence de polypeptides apparentés à l'ACTH et à la β -LPH dans l'hypothalamus, ont été effectuées chez le Cobaye uniquement.

Une partie a pu être menée sur tissu inclus en paraffine mais les résultats les plus complets ont été obtenus sur tissu coupé au cryostat, chez des animaux traités à la colchicine.

1°) Immunoréactivité anti-ACTH COOH-terminal et anti- β -endorphine des neurones hypothalamiques à LH-RH

a) ACTH COOH-terminal

Lorsque nous prélevons les hypophyses en vue d'un examen en coupe sagittale, nous faisons en sorte que la *pars tuberalis* soit préservée. Les blocs comprennent donc l'éminence médiane et l'hypothalamus basal. Sur un tel matériel inclus classiquement en paraffine, nous avons observé dans l'éminence médiane, un très net marquage de fibres et de terminaisons nerveuses après utilisation des anticorps anti-17-39ACTH. Les immunsérums dirigés contre l'ACTH-NH₂-terminal, contre α ou β -MSH et contre le 4-10ACTH ne marquent jamais ces fibres. Seul, l'anti-25-39ACTH les caractérise mais en partie seulement.

Les quatre sérums anti-17-39ACTH utilisés marquent, tous, des terminaisons dans l'éminence médiane mais leurs réactions respectives varient en intensité. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les sérums 19513 et 19515.

Huit animaux normaux, mâles ou femelles, ont fait l'objet d'une étude complète à ce sujet. Chez tous ces animaux, les fibres et les terminaisons nerveuses qui réagissent, sont distribuées dans les deux lèvres de l'éminence médiane. Dans la lèvre ventrale, elles sont régulièrement dispersées et se terminent au voisinage des vaisseaux du plexus porte primaire. Les terminaisons nerveuses se trouvant au contact des capillaires sont toutefois peu nombreuses. Dans la lèvre dorsale, elles forment un réseau beaucoup plus

Immunsérums	P E R I C A R Y O N S		F I B R E S E T T E R M I N A I S O N S N E R V E U S E S			
	Hypothalamus médiobasal	Aire préoptique	E M I N E N C E M E D I A N E		O R G A N E V A S C U L A I R E D E L A L A M E T E R M I N A L E (O V L T)	
			Fibres à LH-RH	Autres fibres (très rares)	Fibres à LH-RH	Autres fibres (très rares)
Anti-LH-RH	0	+++	+++		+++	
Anti-17-39ACTH	+	++	+++	0	+++	0
Anti-β-endorphine	+++	+++	++	+	++	++
Anti-α-endorphine	++	0	0	+	0	+
Anti-1-24ACTH	+++	0	0	+	0	++
Anti-α-MSH	++	0	0	+	0	+
Anti-β-MSH	0	0	0	0	0	0

TABLEAU VI : TABLEAU RECAPITULATIF de la localisation des marquages anti-(ACTH, MSH, endorphines)
dans l'hypothalamus.

L'intensité du marquage est estimée en + :

- + : faible
- ++ : modéré
- +++ : fort
- 0 : absence de marquage.



dense (Pl. XXIV, A1), surtout dans la région du genou de la tige hypophysaire, se répartissant plus postérieurement dans une région située sous la *pars tuberalis* dorsale. Cette topographie évoque celle des fibres à LH-RH (LEONARDELLI et coll., 1973 ; BARRY et coll., 1973 a et b). En outre, l'analogie entre les réactions anti-LH-RH et anti-17-39ACTH est extrêmement frappante, quand elles sont réalisées sur coupes adjacentes (Pl. XXIV, A1 et B1). Cependant, étant donné les dimensions des terminaisons nerveuses (de l'ordre du micron) et l'épaisseur des coupes (2 μ m pour les plus fines), il est impossible d'affirmer qu'il s'agit bien des mêmes fibres.

Pour comparer ces réactions et en tirer une conclusion sûre, il devenait indispensable de les réaliser successivement sur une même coupe. Autrement dit, la réaction effectuée la première devait disparaître totalement, de façon à ce que le tissu fût prêt pour la deuxième. Pour éviter les résultats erronés, il était impératif d'éliminer les immunoglobulines fixées au cours de la première réaction (voir Chapitre 1, D, 3°).

La propriété du précipité bleu donné par le 4-chloro-1-naphtol en présence de peroxydase, d'être soluble dans les solvants organiques, détermina notre choix de ce chromagène pour la révélation de la première réaction. L'élimination des anticorps fixés posa par contre plus de problèmes. En effet, les traitements d'éluion proposés et utilisés lors de la détection simultanée de deux antigènes différents (NAKANE, 1968 ; VANDESANDE et DIERICKX, 1975), se sont révélés inefficaces sur notre matériel, avec les immunosérums utilisés. Ces méthodes ont toujours conduit à renforcer le premier marquage en réalisant involontairement la réaction dite "sandwich". Pour cette raison, nous avons été amenés à mettre au point un traitement des coupes, capable de provoquer la rupture effective de la liaison antigène-anticorps. Pour prouver l'identité LH-RH des fibres réagissant aux anti-17-39ACTH, deux coupes adjacentes sont traitées, chacune avec l'un des immunosérums. Les réactions révélées au chloro-naphtol sont photographiées, puis les lamelles sont démontées et les coupes sont décolorées à l'acétone. Le traitement d'éluion leur est appliqué puis, après un rinçage soigneux, chacune est traitée avec l'immunosérum différent de celui qui avait été utilisé dans la première réaction. Cette façon de procéder permet la comparaison croisée des résultats (Pl. XXIV) prouvant ainsi que les mêmes fibres nerveuses réagissent aux anti-LH-RH et aux anti-17-39ACTH.

Cependant, si qualitativement les marquages des fibres sont identiques, quantitativement, il n'en est pas de même. En effet, la réaction anti-LH-RH est toujours beaucoup plus intense que la réaction anti-17-39ACTH (Pl. XXV).

Des comparaisons analogues ont été également effectuées en ce qui concerne le marquage des corps cellulaires : les anticorps anti-17-39ACTH se fixent sur des péricaryons parvocellulaires situés dans les régions suprachiasmatique et préoptique. Par marquages successifs anti-LH-RH puis anti-17-39ACTH (Pl. XXV, B1 et B2), nous avons montré que les mêmes corps cellulaires réagissent. Compte tenu d'une part, de l'origine synthétique des antigènes utilisés pour produire les immunosérums anti-17-39ACTH et anti-LH-RH, et d'autre part, de l'absence de parenté chimique entre l'ACTH et le LH-RH, les réactions croisées au niveau tissulaire, sont peu probables. Cependant, des tests d'absorption ont été pratiqués pour éliminer complètement cette possibilité.

Le 17-39ACTH inhibe le marquage anti-17-39ACTH des fibres de l'éminence médiane à toutes les doses utilisées (échelonnées entre 4 et 16,5 mg par ml d'immunosérum non dilué). Une préabsorption par le LH-RH (doses échelonnées entre 0,2 et 25 mg de sérum non dilué) n'affecte pas le marquage anti-17-39ACTH. Le marquage anti-LH-RH est supprimé par une absorption préalable avec le LH-RH (les doses échelonnées entre 0,2 et 25 mg sont toutes saturantes). Le 17-39ACTH utilisé à des doses échelonnées entre 4 et 16,5 mg est sans effet sur la réaction anti-LH-RH.

REMARQUE : Sur le matériel fixé par perfusion et coupé au cryostat, préparé dans le but d'étudier les répartitions de β -endorphine et d'enképhaline, la réaction anti-17-39ACTH a été vérifiée. En ce qui concerne les neurones à LH-RH, les résultats donnés par les deux méthodes, sont identiques (Pl. XXVI). La méthode au cryostat est supérieure pour ce qui est de la réaction des cellules de l'hypothalamus médiobasal (voir au 2°) du même paragraphe). En effet, après inclusion en paraffine, de très faibles réactions anti-17-39ACTH avaient été observées sur des péricaryons situés dans l'épaisseur du plancher du troisième ventricule, mais étant donné l'intensité liminaire du marquage, nous les avons considérées comme non significatives.

b) β -endorphine

1 - Matériel inclus en paraffine

Les premiers anticorps anti- α -endorphine et anti- β -endorphine mis à notre disposition par Mr DUBOIS ont également été testés sur l'éminence médiane.

Aucun résultat n'est obtenu avec l'anti- α -endorphine alors que les deux anti- β -endorphine (19645 et 19646) induisent le marquage de fibres dans la zone externe de l'éminence médiane.

Les marquages successifs effectués ont tous montré que les fibres révélées étaient des fibres à LH-RH.

Pour contrôler la spécificité de la réaction anti- β -endorphine des fibres à LH-RH, l'immunsérum anti- β -endorphine a été préabsorbé par le LH-RH à des doses échelonnées entre 0,2 et 25 mg par ml de sérum pur. Aucune de ces doses ne s'est révélée apte à empêcher le marquage.

Les réactions anti- β -endorphine sur matériel inclus en paraffine ont cependant toujours été modérées et c'est pourquoi, nous avons voulu compléter cette étude sur matériel coupé au cryostat.

2 - Matériel coupé au cryostat

Les conditions techniques auxquelles sont soumis les antigènes tissulaires au cours de cette méthode sont indéniablement plus favorables à la conservation de l'immunoréactivité que celles de la technique à la paraffine, si bien que les réactions sur les terminaisons nerveuses de l'éminence médiane s'en trouvent considérablement renforcées (Pl. XXVIII et XXIX).

De plus, nous avons recouru au traitement des animaux par la colchicine dans le but d'augmenter la quantité de matériel antigénique révélable dans les corps cellulaires, selon le protocole qui avait permis à BARRY et coll. (1973 a et b) de révéler les péricaryons à LH-RH.

Avec cette façon de procéder, les résultats préliminaires obtenus sur coupes à la paraffine sont confirmés et précisés. Les fibres marquées par les anti- β -endorphine sont effectivement des fibres à LH-RH (Pl. XXVII). Il apparaît cependant que les fibres à LH-RH situées dans les régions les plus caudales de l'éminence médiane, c'est-à-dire vraisemblablement dans des zones où elles se résolvent en boutons terminaux, contiennent peu ou pas de déterminants antigéniques fixant les anti- β -endorphine (Pl. XXVII, B1 et B2). Cette particularité est d'autant plus remarquable que la réaction anti-17-39ACTH paraît intéresser l'ensemble de la fibre à LH-RH. Au cours des marquages successifs pratiqués dans un but de comparaison, la réaction anti- β -endorphine doit toujours être effectuée la première. En effet, le traitement chimique d'éluion semble néfaste à la conservation de l'immuno-réactivité anti- β -endorphine alors qu'il ne paraît gêner en rien la réaction anti LH-RH.

Les anti- β -endorphine marquent également de nombreuses fibres dans la région de l'organe vasculaire de la lame terminale (crête supra-optique chez le Cobaye). Par comparaison de coupes adjacentes d'une part, et d'autre part, en pratiquant des marquages successifs, il apparaît que, les anti- β -endorphine se fixent sur des fibres à LH-RH mais que d'autres fibres sont également marquées (Pl. XXX). Dans cette région, cependant, les réactions dirigées contre 17-39ACTH et LH-RH donnent des résultats exactement superposables comme cela avait déjà été noté dans l'éminence médiane.

Après traitement par la colchicine, de nombreux péricaryons de l'aire préoptique réagissent fortement aux anti-LH-RH. Des marquages successifs permettent de montrer que tous ces péricaryons sont aussi marqués par les immunosérums anti- β -endorphine (Pl. XXX) et anti-17-39ACTH.

REMARQUE : De tous les immunosérums dirigés contre les polypeptides hypophysaires, seuls les anti-17-39ACTH et anti- β -endorphine marquent le système à LH-RH. Les anti-1-24ACTH, anti- α -MSH et anti- α -endorphine marquent d'autres neurones qui contiennent également des déterminants antigéniques fixant les anti-17-39ACTH et anti- β -endorphine. Les péricaryons de ces neurones sont localisés dans l'hypothalamus médiobasal (Pl. XXVIII).

2°) Immunoréactivité anti-(ACTH, MSH, endorphines) de neurones de l'hypothalamus médiobasal

Le couplage du traitement à la colchicine des animaux utilisés, et de la technique de coupes au cryostat se révèle très favorable à l'étude du système de neurones, caractérisé par la présence de déterminants antigéniques ACTH, MSH et endorphines. Des marquages d'intensité variable ont été obtenus avec les immunosérums anti-1-24ACTH, anti-17-39ACTH, anti- α -MSH, anti- α -endorphine et anti- β -endorphine.

a) Description du système formé par les neurones immunoréactifs

Tous ces immunosérums marquent des péricaryons qui ne réagissent pas aux anti-LH-RH. Les corps cellulaires immunoréactifs sont répartis dans une aire hypothalamique enveloppant la base du troisième ventricule. Ils sont particulièrement abondants, dans les noyaux arqué et prémillaire, autour du récessus infundibulaire et dans le plancher du troisième ventricule (Pl. XXVIII). Exception faite des cellules préoptiques à LH-RH réagissant aux anti-17-39ACTH et anti- β -endorphine, aucune autre cellule hypothalamique marquée n'a été observée en dehors de cette zone médiobasale.

Les projections axonales de ces péricaryons ne se font pas sur l'éminence médiane voisine. En effet, seuls les anti-17-39ACTH et anti- β -endorphine marquent des terminaisons nerveuses dans la zone externe et nous avons toujours constaté qu'il s'agissait des terminaisons à LH-RH. Tout au plus quelques grosses fibres (ne réagissant pas aux anti-LH-RH) et faisant plutôt penser à des troncs dendritiques peuvent être observées dans la zone interne, en bordure du récessus infundibulaire.

Dans la région de l'organe vasculaire, de nombreuses fibres immunoréactives sont, par contre, présentes. L'anti- β -endorphine marque les fibres à LH-RH et d'autres qui ne contiennent pas le décapeptide (Pl. XXX). Les anti-1-24ACTH, anti- α -MSH et anti- α -endorphine, ne se fixent que sur des fibres non réactives aux anti-LH-RH. Nous n'avons pas effectué de confrontations systématiques entre les différents marquages, mais la réaction anti- β -endorphine a été comparée respectivement, aux marquages anti-1-24ACTH, anti- α -MSH et anti-17-39ACTH. Les résultats montrent que les fibres marquées par les immunosérums

anti-1-24ACTH et α -MSH contiennent également des déterminants fixant les anti- β -endorphine, mais que le 17-39ACTH n'apparaît que dans les fibres réagissant à la fois aux anti-LH-RH et aux anti- β -endorphine.

Par ailleurs, dans la région située immédiatement devant la commissure blanche antérieure, de nombreuses fibres sont aussi marquées par les anti- β -endorphine, anti- α -MSH, anti- α -endorphine et anti-1-24ACTH. Elles sont différentes des fibres à LH-RH présentes dans cette région, sauf en ce qui concerne quelques unes d'entre elles, marquées par les anti- β -endorphine.

Il apparaît donc vraisemblable que les péricaryons immunoréactifs de l'hypothalamus médiobasal envoient leurs axones en direction de l'organe vasculaire de la lame terminale et aussi vers les régions supérieures extrahypothalamiques. En effet, les fibres situées devant la commissure blanche ont toujours une direction ascendante.

b) Déterminants antigéniques présents dans ce système de neurones

Parmi les différents immunosérums que nous avons utilisés, ce sont les anti- β -endorphine qui mettent le mieux en évidence ce système de neurones dont les corps cellulaires sont situés dans l'hypothalamus médiobasal. Cependant, ces immunosérums anti- β -endorphine marquent également, comme nous l'avons vu précédemment, le système à LH-RH. Les marquages anti-1-24 ACTH sont aussi de très bonne qualité et ne concernent que le système médiobasal. Par ordre d'intensité décroissante de la réaction, viennent ensuite les marquages anti- α -MSH, anti- α -endorphine et enfin anti-17-39ACTH.

Rappelons que, si ce dernier est relativement faible en ce qui concerne le système médiobasal, il est par contre très net sur le système à LH-RH.

Les essais réalisés avec l' anti-4-10ACTH n'ont donné aucun résultat chez les animaux étudiés.

De plus, malgré une utilisation systématique, les immunosérums anti- β -MSH n'ont jamais induit de marquage dans l'hypothalamus. Cette absence de fixation est certainement à rapprocher de celle qui avait été aussi constatée dans l'hypophyse.

C - DISCUSSION

Nos résultats résumés dans le tableau VI, montrent que dans l'hypothalamus, les neurones de deux systèmes bien définis, contiennent des déterminants antigéniques de polypeptides connus par ailleurs pour être élaborés dans l'adénohypophyse.

L'un de ces systèmes a ses corps cellulaires localisés dans l'hypothalamus médiobasal et caractérisés par des réactions immunohistochimiques marquant les cellules du lobe intermédiaire de l'hypophyse. En effet, la réaction anti- α -MSH y est très nette. Ces résultats concordent parfaitement avec des observations effectuées chez le Rat par d'autres auteurs, sur la présence, dans cette région, de péricaryons immunoréactifs aux anti- β -LPH (WATSON, et coll., 1977 b ; ZIMMERMAN et coll., 1978), anti- β -endorphine (BLOOM et coll., 1978), anti- α -MSH (JACOBOWITZ et O'DONOHUE, 1978), et anti-ACTH (WATSON et coll., 1978). Il ressort que les réactions sont considérablement amplifiées par un pré-traitement des animaux à la vinblastine, (JACOBOWITZ et O'DONOHUE, 1978) ou à la colchicine (SOFRONIEW, 1979 ; BLOCH et coll., 1979), deux substances agissant comme poisons des neurofilaments. Les perturbations du transport axonal qui s'ensuivent sont certainement à l'origine de l'augmentation de l'immunoréactivité par accumulation de matériel dans le péricaryon. Chez l'Homme, cependant, l'immunoréactivité des péricaryons paraît spontanément importante (BLOCH et coll., 1978 a, b et c ; BUGNON et coll., 1979 a et b), comme cela avait été montré pour les corps cellulaires à LH-RH (BARRY, 1976).

Les opinions diffèrent quant à la destination des axones issus des cellules médiobasales, mais selon la thèse qui prédomine, les projections se font ailleurs que dans l'éminence médiane, essentiellement vers des régions extra-hypothalamiques.

Effectivement, WATSON et coll. (1977 b) rapportent que les fibres réagissant aux anti- β -LPH sont surtout abondantes dans le noyau périventriculaire, se retrouvent autour de la commissure blanche puis dans le septum et l'amygdale. BLOOM et coll. (1978) arrivent à des conclusions analogues en ce qui concerne les neurones à β -endorphine, mais signalent en outre la présence de terminaisons nerveuses dans l'éminence médiane, sans toutefois préciser si elles se distribuent dans la zone interne ou la zone externe. Une description très détaillée de la répartition

F I G U R E 16

Représentation schématique des deux systèmes de neurones hypothalamiques véhiculant des peptides apparentés à l'ACTH et à β -LPH (les enképhalines exceptées), chez le Cobaye.

1 - Système caractérisé par la présence de LH-RH, ACTH C-terminal et β -endorphine.

2 - Système caractérisé par la présence de ACTH N et C terminal, α - et β -endorphines et α -MSH.

CA : commissure blanche antérieure

CO : chiasma optique

apo : aire préoptique

hmb : hypothalamus médiobasal

la : lobe antérieur

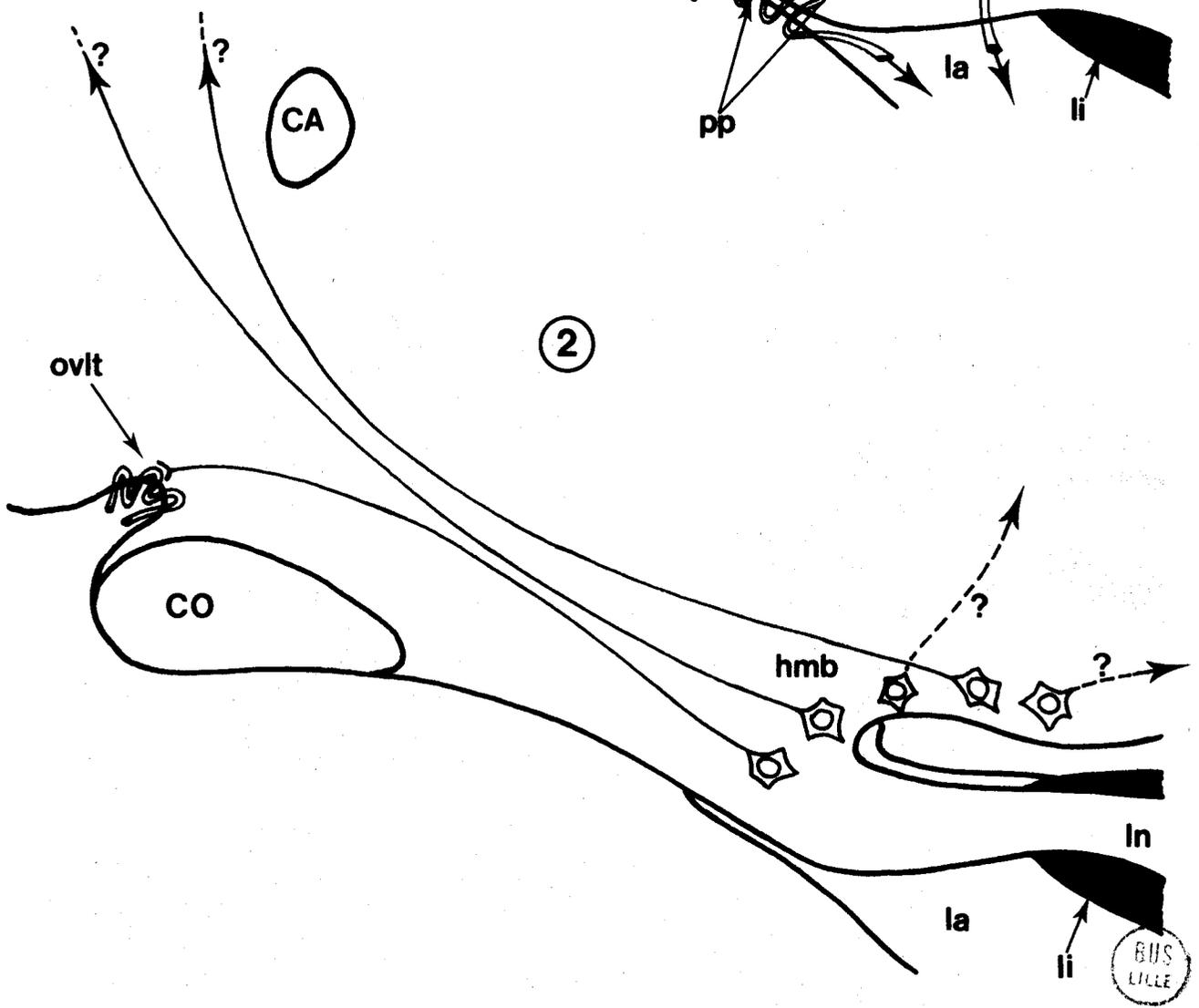
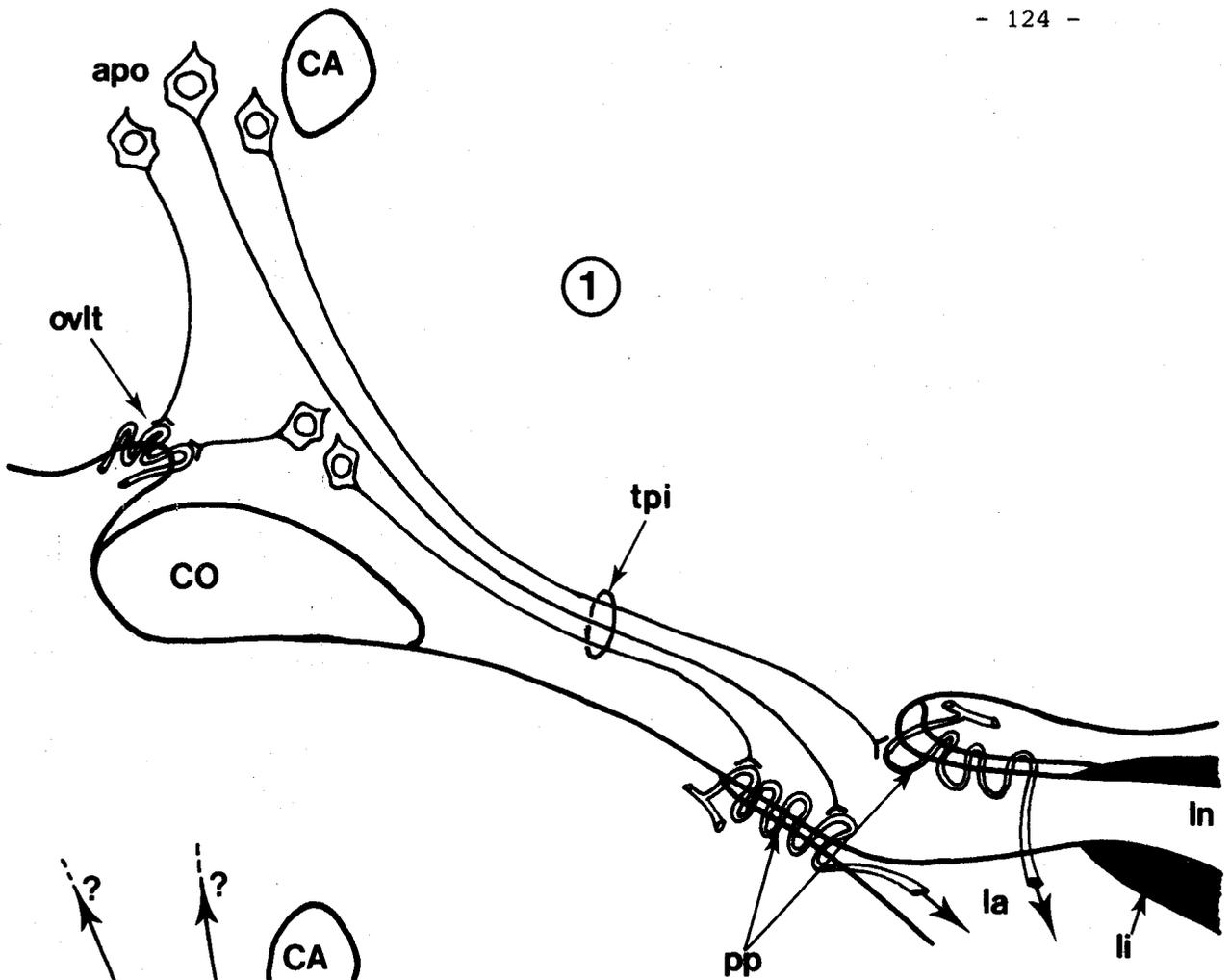
li : lobe intermédiaire hypophyse

ln : lobe nerveux

ovlt : organe vasculaire de la lame terminale

pp : plexus porte hypothalamo-hypophysaire

tpi : tractus préoptico-infundibulaire.



des axones et terminaisons réagissant aux anti- α -MSH est faite par JACOBOWITZ et O'DONOHUE (1978). Les observations rapportées dans ce travail sont d'ailleurs confirmées par des résultats obtenus par dosages radioimmunologiques, chez l'animal intact (O'DONOHUE et coll., 1979) ou après désafférentation de certaines zones du cerveau (ESKAY et coll., 1979). Les taux les plus importants d' α -MSH sont détectés dans les régions où les réactions anti- β -LPH et anti- β -endorphine sont observées (septum, aire préoptique, hypothalamus tout particulièrement autour du troisième ventricule, et amygdale).

Pour ce qui est de l'éminence médiane, JACOBOWITZ et O'DONOHUE (1978) précisent que des terminaisons nerveuses à α -MSH y sont présentes mais uniquement dans la zone interne. Utilisant des anticorps dirigés contre la partie N-terminale de l'ACTH, WATSON et coll. (1978) ne signalent pas de fibres dans l'éminence médiane. Ces observations concordent avec nos résultats concluant à l'absence de déterminants 1-24ACTH et α -MSH dans les terminaisons en situation péricapillaire dans le système porte, et attribuant aux axones du système médiobasal une destination autre que l'éminence médiane.

Au contraire, BLOCH et coll. (1978 b) ainsi que BUGNON et coll. (1979 a et b), qui démontrent chez l'Homme la présence simultanée de peptides apparentés à ACTH, MSH et LPH dans des péricaryons infundibulaires, suggèrent que "ces neurones immunoréactifs constituent un système hypothalamo-infundibulaire qui prend naissance dans le noyau infundibulaire et se termine au contact des vaisseaux de l'infundibulum". Il est toutefois intéressant de noter que les réactions les plus nettes sont obtenues par ces auteurs après utilisation d'immunsérums dirigés contre le 17-39ACTH ou la β -endorphine. Ce sont en effet des immunsérums analogues qui caractérisent, chez le Cobaye, les fibres à LH-RH de l'éminence médiane.

Chez le Rat, les mêmes auteurs (BLOCH et coll., 1979) rapportent la présence autour des capillaires du système porte hypophysaire de "fibres et terminaisons marquées avec des anti-endorphine et immunsérums apparentés", mais sans préciser s'il existe des différences entre les réactions. Ils insistent cependant sur le fait que ces terminaisons sont distinctes des terminaisons à LH-RH, ce qui est en désaccord avec nos résultats montrant l'identité des fibres marquées par les anti-LH-RH, anti- β -endorphine et anti-17-39ACTH dans la zone externe de l'éminence médiane.

Des observations effectuées chez le foetus humain (LEONARDELLI et TRAMU, 1979) montrent que, comme chez le Cobaye, les péricaryons à LH-RH contiennent des déterminants β -endorphine, alors qu'aucune réaction anti 17-39ACTH n'y a été décelée. Des différences interspécifiques peuvent être à l'origine de cette divergence partielle mais il semble aussi que l'état endocrine très particulier du foetus soit à prendre en considération.

Les résultats obtenus chez le Cobaye concilient en quelque sorte, les opinions en montrant que deux systèmes de neurones hypothalamiques contiennent des peptides apparentés à l'ACTH et à la β -LPH (voir fig. 16, p.124):

- un système à péricaryons infundibulaires ne réagissent pas aux anti-LH-RH, dont les axones sans rapport avec la zone externe de l'éminence médiane, se dirigent vers l'organe vasculaire de la lame terminale et des régions extrahypothalamiques. Les neurones de ce système réagissent aux immunosérums dirigés contre l'ACTH NH₂ et COOH terminal, l' α -MSH, l' α - et la β -endorphines.
- un système à péricaryons préoptiques contenant LH-RH, dont les axones se terminent principalement dans la zone externe de l'éminence médiane mais aussi dans l'organe vasculaire de la lame terminale et des régions extrahypothalamiques (BARRY, 1979). Les neurones de ce système réagissent aux immunosérums dirigés contre le LH-RH, l'ACTH COOH-terminal et la β -endorphine.

La détection par dosage et par immunohistochimie de peptides apparentés aux hormones hypophysaires dans le cerveau, amène à envisager le problème de leur origine.

En particulier, une origine hypophysaire supposerait un transport des hormones de la glande vers l'infundibulum. Par référence aux connaissances acquises au cours des dernières décennies sur les relations nerveuses et sanguines entre hypothalamus et hypophyse, un tel transport est qualifié de rétrograde. De fait, un flux sanguin rétrograde a bien été mis en évidence dans la tige hypophysaire (OLIVER et coll., 1977). En outre, des résultats obtenus par injection intrahypophysaire d'ACTH radioactif (MEZEY et coll., 1978) et par des études anatomiques précises de la vascularisation de l'appareil hypothalamo-hypophysaire (BERGLAND et PAGE, 1978) conduisent leurs auteurs à envisager les différentes possibilités théoriques de transport d'hormones adénohypophysaires vers le cerveau.

F I G U R E 17

A, vascularisation de l'appareil hypothalamo-hypophysaire du Singe Rhesus, schématisée d'après BERGLAND et PAGE (1979).

Les auteurs envisagent l'existence de cinq voies sanguines potentielles pouvant véhiculer les hormones hypophysaires vers le cerveau.

B et C, Deux voies nerveuses (transport axonal rétrograde) sont également proposées par ces auteurs.

ACA, artère communicante antérieure

AHI, artère hypophysaire inférieure

AHM, artère hypophysaire moyenne

AHS, artère hypophysaire supérieure

C, carotide

H, hypothalamus

LA, lobe antérieur

LI, lobe intermédiaire } hypophyse

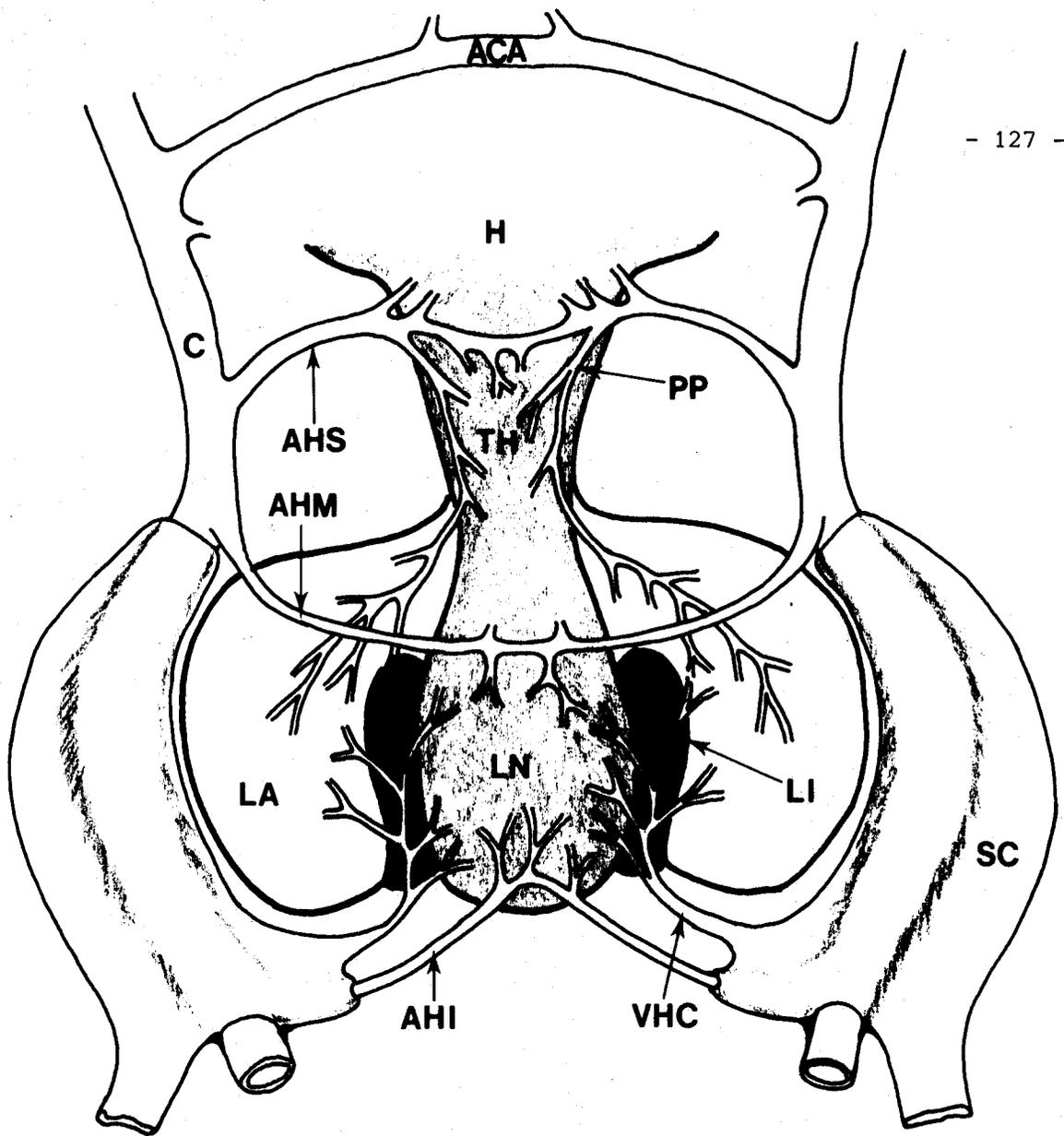
LN, lobe nerveux }

PP, plexus porte hypothalamo-hypophysaire

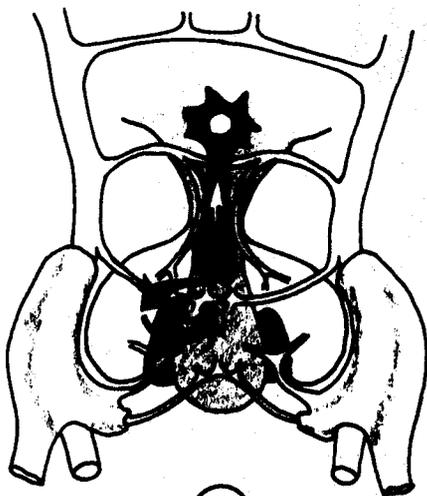
SC, sinus caverneux

TH, tige hypophysaire

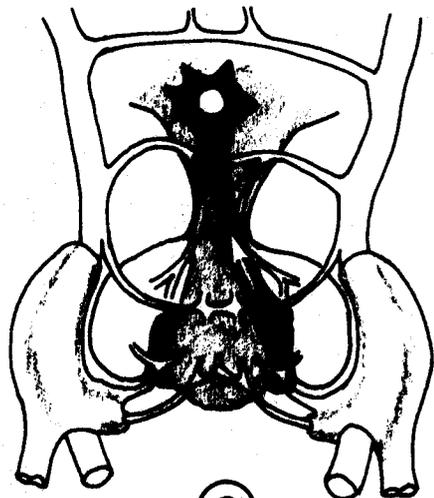
VHC, veine hypophysaire confluyente.



(A)



(B)



(C)

BUS
LILLE

Les voies proposées par BERGLAND et PAGE (1979) ne sont pas toutes sanguines. Deux d'entre elles concernent un éventuel transport d'hormones par un flux axonal rétrograde (Fig. 17, p.127). Selon la première, l'hormone pourrait être directement captée par les terminaisons nerveuses présentes dans le lobe intermédiaire et selon la seconde, l'hormone passerait préalablement dans le lobe nerveux où elle serait reprise par les boutons terminaux des axones. Ces hypothèses modernes ne sont pas sans évoquer celles de COLLIN (1933) sur la neurocrinie hypophysaire. Cet auteur attribuait en effet, un sens ascendant à la colloïde provenant de l'hypophyse, et décrivait les relations morphologiques qu'elle avait avec des péricaryons infundibulaires.

La présence dans le cerveau des peptides ACTH/ β -LPH est-elle le résultat d'un transport rétrograde ou d'une synthèse neuronale ? D'après les travaux effectués chez l'animal hypophysectomisé, aussi bien par dosages (KRIEGER et coll., 1977 a et b ; ROSSIER et coll., 1977 ; OLIVER et PORTER, 1978) que par immunohistochimie (LARSSON, 1977 ; WATSON et coll., 1977 b ; PELLETIER et LECLERC, 1979) l'origine hypophysaire est à écarter. En effet, ni la concentration des peptides, ni leur distribution ne sont significativement affectées par l'hypophysectomie. Cependant dans des conditions tout à fait analogues, d'autres auteurs observent, après élimination de l'hypophyse, une importante baisse des taux cérébraux pour l' α -MSH (VAUDRY et coll., 1978) et pour la β -endorphine (OGAWA et coll., 1979). De plus des dosages effectués chez le Rat, le Lapin, le Chien et le Singe, conduisent MOLDOW et YALOW (1978) à postuler que l'hypophyse est le seul lieu de synthèse de la corticotropine, insistant par ailleurs sur le fait que l'hypophysectomie chez le Rat ne peut jamais être considérée comme complète.

La localisation aux granules de sécrétion, des réactions anti- α -MSH (PELLETIER et DUBE, 1977), anti- β -endorphine (BLOCH et coll., 1978 c) et anti-ACTH (PELLETIER et LECLERC, 1979) dans les neurones, évoque bien une synthèse *in situ*. L'hypothèse de la synthèse est également étayée par le travail de LIOTTA et coll. (1979) effectuée *in vitro* et montrant que l'hypothalamus bovin est capable d'incorporer des acides aminés dans le précurseur de l'ACTH/ β -LPH. Cependant, à propos de cette expérimentation, une remarque restrictive s'impose : bien que l'hypophyse ait été soigneusement éliminée, la préparation hypothalamique utilisée est forcément contaminée par de nombreuses cellules de la *pars tuberalis* qui, chez le Boeuf engaine particulièrement l'infundibulum.

Actuellement donc, bien que le nombre d'arguments expérimentaux en faveur de la synthèse nerveuse de l'ACTH/ β -LPH hypothalamique, soit plus élevé, il n'est pas possible d'écarter l'hypothèse d'une origine adénohypophysaire.

La localisation dans le cerveau, d'hormones hypophysaires, conduit à s'interroger, non seulement sur leur origine, mais aussi sur leur fonction. Pour le moment, en dehors des hormones polypeptidiques de la famille ACTH/ β -LPH, seule la prolactine a été détectée dans des neurones hypothalamiques (FUXE et coll., 1977 ; TOUBEAU et coll., 1979 a et b). Encore qu'il nous semble que ce résultat soit à reconsidérer, car d'après les premiers auteurs, les fibres immunoréactives à l'anti-prolactine sont les mêmes que celles qui réagissent à l'anti-ACTH et, fait troublant, chacune des deux réactions est abolie par une préabsorption des sérums avec la prolactine (N.I.A.M.D.D.) ayant servi d'antigène lors de la production de l'anti-prolactine (FUXE et coll., 1979). Quoiqu'il en soit de la présence de prolactine dans le système médiobasal, aucune hypothèse générale n'a été avancée concernant le rôle des hormones hypophysaires dans le cerveau et particulièrement dans le système limbique. Des informations fragmentaires sont fournies par des travaux rapportant l'effet analgésique de la libération de β -endorphine dans le liquide céphalo-rachidien après stimulation de la région périventriculaire (HOSOBUCHI et coll., 1979), et aussi les effets sur le comportement et l'apprentissage, de l'ACTH (DE WIED, 1976 et 1977 ; BOHUS, 1979) et des endorphines (BLOOM et coll., 1976 ; MEGLIO et coll., 1977 ; BOHUS, 1979).

La présence d'ACTH C-terminal et de β -endorphine dans le système à LH-RH permet d'envisager un éventuel rôle neuroendocrine pour ces peptides. En effet, les substances sont détectées dans les terminaisons nerveuses autour des capillaires du plexus porte. Cette situation peut être considérée comme un très bon argument en faveur d'une action hypophysiotrope restant à définir. Effectivement, RIVIER et coll. (1977) rapportent que la β -endorphine injectée dans le ventricule cérébral latéral a un effet stimulateur sur les sécrétions de PRL et de GH. Par ailleurs, elle agit directement sur la sécrétion de PRL par la cellule hypophysaire en levant l'inhibition induite par la dopamine (ENJALBERT et coll., 1979). Pour ce qui est d'un effet de l'ACTH C-terminal sur

les sécrétions hypophysaires, un seul travail, à notre connaissance, fait état pour le 18-39ACTH (CLIP) d'une action empêchant la stimulation de PRL par la morphine (VALE et coll., 1977). Ce qui revient à dire, qu'assez paradoxalement, deux peptides (β -endorphine et ACTH C-terminal) contenus dans les mêmes fibres ont des actions contraires sur la sécrétion de PRL. Les effets pharmacologiques évoqués ci-dessus ne se manifestent peut-être pas dans les mécanismes physiologiques, mais on peut tout de même remarquer dès maintenant que l'exemple du couple de peptides ayant des effets opposés ne paraît pas être isolé. En effet, la somatostatine, qui freine la sécrétion de GH et l'enképhaline qui la stimule, sont présentes dans les mêmes terminaisons nerveuses de l'éminence médiane (voir ch. 3, II ; TRAMU et LEONARDELLI, 1979 ; TRAMU et coll., 1980).

Par ailleurs, le fait que LH-RH, β -endorphine et ACTH C-terminal soient présents dans un même système évoque pour ces trois peptides des effets combinés qui demeurent à établir.

Pour conclure sur la question des polypeptides apparentés à l'ACTH/ β -LPH dans l'hypothalamus, nous insisterons sur leur présence dans deux systèmes très différents. Si l'infundibulum est pris comme référence topographique, le premier est centrifuge alors que le second est centripète (Fig. 16, p.124).

Existe-t-il des relations entre ces deux systèmes ? Les neurones à LH-RH synthétisent-ils les séquences β -endorphine et ACTH C-terminal, ou ont-ils la possibilité de les capter ? Cet hypothétique captage de protéines par des neurones a été suggéré par GUILLEMIN (1978). Le développement des connaissances sur ces problèmes apportera certainement des renseignements nouveaux concernant le fonctionnement de l'appareil hypothalamo-hypophysaire.

II - ENKEPHALINES

A - ETAT DES CONNAISSANCES

La présence d'enképhalines dans le cerveau n'a pas le caractère inattendu de celle des peptides hypophysaires ACTH, MSH et LPH. En effet, ce sont leurs propriétés morphinomimétiques sur le système nerveux qui sont à l'origine de leur découverte (HUGHES, 1975). Le fait insolite réside cette fois dans leur parenté chimique avec la β -LPH hypophysaire.

La détermination de la séquence peptidique des enképhalines, leur synthèse puis l'élaboration d'immunsérums spécifiques ont permis d'étudier directement leur distribution dans le cerveau par les techniques de dosages radioimmunologiques et par immunohistochimie. Jusqu'ici, le problème des morphinomimétiques endogènes avait été abordé sous l'angle de la localisation des récepteurs aux opiacés par injection d'un agoniste tritié de la morphine (PERT et coll., 1975 ; ATWEH et KUHAR, 1977 a, b et c) ou sous l'angle de l'appétitude d'extraits de certaines régions à inhiber la fixation de la morphine sur son récepteur (SIMANTOV et coll., 1976 a et b).

La première localisation immunohistochimique montra un marquage d'axones et de terminaisons nerveuses (ELDE et coll., 1976). Elle confirma donc les résultats obtenus par centrifugation différentielle concluant à l'existence d'un facteur morphinomimétique dans la fraction synaptosomale (PASTERNAK et coll., 1975 ; SIMANTOV et coll., 1976 b). Pas plus que ceux de ELDE et coll. (1976), les travaux de SIMANTOV et coll. (1977) ne mentionnent la présence de péricaryons immunoréactifs. Seules les aires de répartition des fibres sont décrites. Cependant après traitement des animaux à la colchicine, de nombreux corps cellulaires sont observés dans des régions variées réparties dans tout le système cérébrospinal (HOKFELT et coll., 1977 ; SAR et coll., 1978). Dans tous ces travaux utilisant soit des anticorps dirigés contre la méthionine-enképhaline, soit des anticorps dirigés contre la leucine-enképhaline, les auteurs soulignent les analogies existant entre les deux réactions. Il est vrai que les anti-leucine-enképhaline montrent une importante réaction croisée avec la méthionine-enképhaline. Cependant, par dosage, des différences ont été notées dans la répartition des deux pentapeptides (HUGHES et coll., 1977 ; YANG et coll.,

1977 ; MILLER et coll., 1978 ; OSBORNE et coll., 1978). Mise à part cette divergence, les résultats obtenus par dosages radioimmunologiques et par immunocytochimie sont remarquablement superposables quant à la répartition cérébrale de l'immunoréactivité dans plusieurs espèces comme le Rat (ROSSIER et coll., 1977 ; HONG et coll., 1977 ; KOBAYASHI et coll., 1978), le Boeuf (LINDBERG, et coll., 1979) et l'Homme (GRAMSCH et coll., 1979).

Pour ce qui concerne la localisation des enképhalines dans l'infundibulum, les résultats sont peu précis. SIMANTOV et coll. (1977) parlent de fluorescence "substantielle" dans cette région alors que WATSON et coll. (1977 a) insistent sur la très faible densité en fibres immunoréactives de l'éminence médiane et du noyau arqué du Rat. La présence de fibres enképhalinerigiques dans la zone externe de l'éminence médiane est cependant mentionnée dans cette espèce, pour la première fois par HOKFELT et coll. (1978). Le fait est confirmé par SAR et coll. (1978), sans précision complémentaire. Chez le Cobaye, nous avons décrit (TRAMU et LEONARDELLI, 1979) de très nombreuses fibres contenant des enképhalines, distribuées au contact des vaisseaux du plexus porte. Nous avons donc tenté de déterminer si possible, leur nature et leur origine.

B - RESULTATS

1°) Spécificité des immunosérums

Comme nous l'avons dit au Chapitre 1, les trois immunosérums que nous avons produits ont été testés par deux méthodes.

a) Immunohémolyse passive indirecte

Cette technique a permis d'apprécier le titre et la spécificité des sérums.

Les anti-méthionine-enképhaline fixent environ dix fois plus la méthionine-enképhaline que la leucine-enképhaline. L'anti-leucine-enképhaline qui, parmi les trois immunosérums, est celui qui possède le plus haut titre, fixe seulement deux fois plus de leucine-enképhaline que de méthionine-enképhaline. Ces résultats mettent en évidence des réactions croisées non négligeables entre l'immunosérum et l'enképhaline hétérologue, tout particulièrement en ce qui concerne l'anti-leucine-enképhaline.

Les trois immunosérums n'ont par contre, aucune réaction croisée avec l' α -endorphine.

b) Radioimmunologie

L'étude n'a pu être complète en raison de l'échec du marquage à l'iode de la leucine-enképhaline. Cependant, dans ce système compétitif, un excès 250 fois molaire de leucine-enképhaline est nécessaire pour inhiber la fixation de méthionine-enképhaline radioactive. Toujours dans ce système, l'anti-leucine-enképhaline ne fixe pas l'enképhaline hétérologue marquée.

Des tests effectués, il ressort que les anticorps reconnaissent tous la méthionine-enképhaline, y compris l'immunosérum anti-leucine-enképhaline. Dans la discussion, nous aborderons le problème de la

nature exacte du produit détecté mais, dès à présent, il est possible d'affirmer qu'il s'agit bien d'enképhalines étant donné que nos anticorps ne réagissent pas avec les endorphines pourtant chimiquement très proches.

2°) Marquages anti-enképhaline dans l'hypothalamus (Fig.18, p.143)

a) Fibres et terminaisons nerveuses

1 - Dans l'éminence médiane

α) Microscopie photonique
.....

Les premiers essais ont été effectués sur coupes à la paraffine mais devant les résultats peu probants, nous avons poursuivi l'étude sur coupes au cryostat.

Dans un premier temps, c'est sur l'animal adulte normal que nous avons porté notre choix, puis dans le but de déterminer l'origine cellulaire des fibres marquées, sur des animaux traités à la colchicine.

Animal normal

Les cinq immunosérums utilisés (4 dirigés contre la méthionine-enképhaline et 1 contre la leucine-enképhaline) ont tous nettement marqué des terminaisons nerveuses situées dans la zone externe de l'éminence médiane.

Dans la lèvre ventrale, la réaction met en évidence de très nombreuses fibres qui adoptent une disposition en feutrage autour des capillaires. Cet aspect évoque fortement le marquage anti-somatostatine, si bien que nous avons effectué des comparaisons par marquage successif de l'enképhaline puis de la somatostatine. Cet ordre dans la mise en oeuvre des réactions, est important, car si la technique d'élution ne gêne en rien le marquage anti-somatostatine, elle provoque une forte détérioration de l'immunoréactivité anti-enképhaline.

A un faible grossissement, la comparaison montre que les résultats des deux réactions sont superposables, encore que le marquage

anti-stomatostatine soit toujours le plus intense des deux (Pl. XXXI, A et B). A un grossissement plus élevé (Pl. XXXI, C et D), il est possible d'observer des superpositions des deux réactions pour une même fibre. Mais ce grossissement permet aussi de constater que toutes les fibres à somatostatine semblent être mises en évidence et que, d'autre part, des fibres de la zone interne ne réagissant pas à l'anti-somatostatine fixent nettement l'anti-enképhaline.

Des comparaisons effectuées entre les marquages anti-enképhaline et anti-LH-RH montrent que les fibres révélées par chacun des deux immunsérums sont nettement différentes (Pl. XXXI, E et F).

Animal traité par la colchicine

Bien que destiné à l'étude des péricaryons contenant des enképhalines, ce traitement s'est révélé apparemment favorable à celle des fibres enképhalinerigiques distribuées dans l'éminence médiane.

Dans la zone externe, l'apparence des fibres ne semble pas être modifiée et la superposition avec les marquages anti-somatostatine est bonne (Pl. XXXII, XXXIII et XXXIV). Par contre, dans la zone interne les fibres immunoréactives sont plus nombreuses que chez l'animal non traité et se répartissent autour du récessus infundibulaire. A un plus fort grossissement (Pl. XXXV, A et C), leur aspect évoque plutôt celui de terminaisons nerveuses qui sont très souvent en association morphologique avec des prolongements cellulaires dont la nature exacte ne peut être affirmée en microscopie photonique. Cependant, d'après la localisation et l'orientation de ces prolongements, il est probable qu'ils proviennent d'épendymocytes. Des éléments ressemblant aussi à des boutons terminaux dessinent le contour de petites structures circulaires d'une taille inférieure à celle d'un neurone. Ces images sont observées au voisinage de l'assise épendymocytaire dans l'éminence médiane (Pl. XXXV, A) mais également dans le noyau arqué (Pl. XLI, C et D). Il pourrait s'agir de prolongements gliaux sectionnés transversalement près du corps cellulaire.

D'une façon générale, il faut noter que les structures enképhalinerigiques marquées dans la zone interne de l'éminence médiane, présentent une unité d'aspect avec celles qui se répartissent autour de la base du troisième ventricule dans une aire formée par le noyau arqué et la région prémamillaire.

β) Microscopie électronique
.....

Le caractère inattendu des résultats et tout particulièrement l'insolite association entre somatostatine et enképhaline, nous a conduit à effectuer en collaboration avec J.C. BEAUVILLAIN et D. CROIX, une étude ultrastructurale des marquages anti-enképhaline dans l'éminence médiane. Un article à ce sujet est actuellement sous presse (BEAUVILLAIN, TRAMU et CROIX, Neuroscience, 1980).

Pour aborder le problème, deux techniques ont été utilisées. Elles fournissent des renseignements à la fois concordants et complémentaires. Dans la première, la réaction immunocytoologique a été pratiquée avant enrobage, alors que la deuxième consiste en un marquage réalisé sur coupes ultrafines et, est donc qualifiée de technique après enrobage.

Technique immunocytoologique avant enrobage

Les immunsérums anti-enképhaline permettent la mise en évidence de très nombreuses sections d'axones et de terminaisons nerveuses situées dans la zone externe de l'éminence médiane. La méthode "avant enrobage" donne des préparations dont le contraste est satisfaisant, de sorte que les membranes sont en général bien visibles. Elle est donc particulièrement favorable à la démonstration de la localisation péricapillaire des terminaisons immunoréactives (Pl. XXXVI). A l'intérieur du bouton terminal, le marquage se situe sur des granules d'environ 1100 Å de diamètre, et apparaît sous la forme de petites taches de précipité de DAB. Le nombre de ces taches, et par conséquent l'intensité du marquage, varie d'un grain à l'autre (Pl. XXXVI, A et C). En plus de la réaction granulaire, s'opère une densification de la membrane des petites vésicules dont le diamètre avoisine 500 Å (Pl. XXXVI, A, B et C). Certaines terminaisons, marquées paraissent même ne contenir que des vésicules de ce type (Pl. XXXVI, B).

Dans la zone interne de l'éminence médiane, peut-être en raison d'une préservation moins bonne du tissu, la localisation subcellulaire précise du marquage est plus difficile à déterminer. Cependant, les sections de fibres immunoréactives sont très clairement repérables et toujours grâce au contraste général que donne la méthode "avant enrobage", les structures environ-

nantes peuvent être reconnues.

Dans ces conditions, de nombreuses relations entre fibres marquées et épendymocytes, peuvent être observées. Tout particulièrement, dans la zone hypendymaire (située immédiatement sous l'assise formée par la juxtaposition des corps cellulaires des épendymocytes), les fibres réactives sont nombreuses et très souvent des contacts sont observés entre ces fibres et les prolongements des épendymocytes (Pl. XXXVIII, A et B).

Technique immunocytoologique après enrobage

Avec cette technique aussi, que les anticorps soient dirigés contre la méthionine-enképhaline ou la leucine-enképhaline, les marquages sont analogues. Mais contrairement à ce qui était obtenu avec la technique précédente, les structures non immunoréactives ne sont que peu visibles. Dans la zone palissadique de l'éminence médiane, les immunosérums révèlent des terminaisons nerveuses dont tous les granules sont fortement marqués par le complexe PAP. Ces granules, d'un diamètre moyen de 1100 Å correspondent exactement aux granules de grande taille révélés par l'autre méthode. Cependant, avec la technique "après enrobage", aucune petite vésicule n'est marquée, alors que les granules d'une terminaison réagissent dans leur ensemble (Pl. XXXVII, C).

Des coupes ont également été traitées dans le but de mettre en évidence les sites à somatostatine. De nombreuses terminaisons nerveuses sont révélées dans la zone externe de l'éminence médiane. Dans une terminaison donnée, le marquage se situe sur l'ensemble des granules qu'elle renferme. Le diamètre des grains marqués est d'environ 1100 Å et en aucun cas, des formations plus petites ne sont révélées (Pl. XXXVII, D).

2 - Dans l'hypothalamus médiobasal

Cette région est particulièrement riche en fibres et surtout en terminaisons nerveuses. Ailleurs dans l'hypothalamus, bien que quelques fibres puissent être observées, aucune concentration particulière n'a été notée.

La zone immunoréactive comprend le noyau arqué (Pl. XXXII, A ; XXXIII A et XXXVIII) et enveloppe la base du troisième ventricule. Les fibres sont très abondantes dans toute l'épaisseur du plancher du troisième ventricule (Pl. XXXIV et XLI, A), dans les régions prémamillaires (Pl. XXXIV, XXXIX) et dans le corps mamillaire proprement dit (Pl. XL). Comme nous l'avons déjà dit, le marquage présente des analogies avec celui de la zone interne de l'éminence médiane. Il intéresse des formations qui semblent correspondre à des boutons terminaux (Pl. XLI, C et D) entourant des éléments arrondis, non immunoréactifs. La nature de ces éléments est difficile à préciser. Leur taille se situe aux alentours de celle d'un péricaryon. Il pourrait donc s'agir soit de corps cellulaires, soit de gros prolongements dendritiques ou épendymocytaires. Dans le plancher du récessus prémamillaire, les terminaisons marquées adoptent une disposition en réseau et dans cette zone tout au moins, il est probable qu'elles entourent des prolongements d'épendymocytes.

En dehors des terminaisons, quelques péricaryons parvocellulaires sont révélés, éparpillés dans toute cette aire hypothalamique basale, un peu plus nombreux toutefois dans le corps mamillaire (Pl. XLI, B). Au cours des comparaisons effectuées entre les réactions anti-enképhaline et anti-somatostatine, nous n'avons jamais observé de superposition d'images dans la région basale, hors la zone externe de l'éminence médiane (Pl. XXXIX, B). L'association entre les deux peptides n'existe donc que dans les terminaisons péricapillaires du plexus porte hypothalamo-hypophysaire.

b) Péricaryons

1 - Dans l'hypothalamus périvertriculaire antérieur

En raison du marquage, dans la zone externe de l'éminence médiane, des mêmes terminaisons après utilisation des anti-enképhaline et anti-somatostatine, une attention toute particulière a été apportée à l'étude de la région périvertriculaire connue pour être une aire de répartition de péricaryons à somatostatine (DUBOIS et KOLODZIEJCZYK, 1975 ; ELDE et PARSONS, 1975 ; KRISCH, 1978). La localisation hypothalamique de ces corps cellulaires n'est pas stricte, puisqu'ils sont aussi présents dans l'aire

préoptique. Plus que leur distribution topographique, c'est leur situation périventriculaire qui est remarquable. Ils se répartissent en effet dans une étroite lame de tissu sous épendymaire. Ils sont probablement à l'origine de la riche innervation somatostatinergique de l'éminence médiane, mais cette relation n'a jamais été expérimentalement démontrée.

Dans cette région périventriculaire, des corps cellulaires immunoréactifs aux anti-enképhaline sont présents, mais d'une manière générale, ils sont moins nombreux et moins réactifs que ceux qui sont marqués par les anti-somatostatine. La comparaison des deux réactions sur une même coupe, montre que les mêmes cellules peuvent être révélées par les deux immunsérums (Pl. XXXV, E et F) mais que ce n'est pas la règle. En effet, de nombreuses images de superposition ont été obtenues chez deux animaux utilisés alors que chez les quatre autres, elles n'étaient jamais qu'exceptionnelles.

En outre, certaines cellules réagissant aux anti-enképhaline, ne réagissent pas aux anti-somatostatine (Pl. XXXV, E à H) (ou inversement), alors que chez tous les animaux étudiés, les terminaisons de la zone externe de l'éminence médiane fixent, dans leur ensemble, les deux immunsérums.

Il semble donc, que les péricaryons à somatostatine puissent contenir, mais de façon occasionnelle, une substance apparentée aux enképhalines.

2 - Dans l'hypothalamus médiodorsal

C'est dans cette région que les marquages cellulaires anti-enképhaline sont les plus remarquables. En effet, tous les immunsérums utilisés mettent en évidence un groupe dense de neurones magnocellulaires situé, dans le sens antéro-postérieur, à l'aplomb de la naissance de l'éminence médiane (Pl. XL, A). Ces neurones fortement immunoréactifs sont par ailleurs groupés en un noyau bien circonscrit. Ils présentent de gros prolongements dendritiques mais il est rare d'observer dans leur environnement immédiat des fibres axoniques en chapelet (Pl. XL, B).

Le repérage topographique précis de ce noyau a été effectué sur coupes frontales. A hauteur de la partie caudale du noyau paraventriculaire, il apparaît plaqué sur la face interne du fornix. Plus postérieure-

ment, il s'éloigne de la ligne médiane pour occuper une position suprafor nicale (Fig. 18, p.143).

Dans son atlas de l'hypothalamus du Cobaye, établi en coordonnées stéréotaxiques, POULAIN (1974), par référence à des travaux anatomiques antérieurs, établit une distinction entre un groupe de neurones magnocellulaires (formant le noyau magnocellulaire dorsal) et un groupe plus caudal et plus externe, également formé de neurones magnocellulaires (le noyau paraventriculaire accessoire). Nos résultats montrent que ce sont les neurones de ces deux noyaux qui réagissent aux anti-enképhaline (Fig. 18, p.143) et forment ainsi une entité anatomique et vraisemblablement fonctionnelle.

Les comparaisons que nous avons effectuées sur coupes adjacentes ou après marquages successifs d'une même coupe, montrent que les cellules de ce noyau ne réagissent ni à l'anti-somatostatine, ni à l'anti-neurophysine.

3 - Dans l'hypothalamus médioventral

Comme nous l'avons déjà signalé, quelques péricaryons parvocellulaires du noyau arqué et des noyaux prémamillaires et mamillaires sont révélés par les anti-enképhaline. En fait, dans tout l'hypothalamus, de tels péricaryons immunoréactifs sont observables. Cependant, ils sont particulièrement nombreux dans le noyau ventromédian (Pl. XXXVIII). Comme nous avons pu le vérifier précisément par marquages successifs, aucun de ces corps cellulaires ne contient de somatostatine. Par contre, la même méthode permet de constater que de très nombreuses et très fines terminaisons somatostatiner giques sont présentes dans cette région, alors que les anti-enképhaline ne les révélaient pas (Pl. XXXIX, A et B). De même les réactions anti-somatostatine marquent, disséminés dans l'hypothalamus médian et basal, quelques péricaryons qui n'étaient pas immunoréactifs aux anti-enképhaline (Pl. XXXII, B ; XXXIII, B ; XXXIX, B).

4 - Ailleurs dans l'hypothalamus

Nous venons de décrire les concentrations remarquables de péricaryons immunoréactifs, mais d'une façon générale, dans tout l'hypothalamus des neurones sont révélés. Cependant, ils sont très disséminés et souvent isolés. C'est ainsi que quelques éléments magnocellulaires du noyau supraoptique et du noyau paraventriculaire peuvent présenter une réaction mais, d'après nos observations, ces marquages ont toujours un caractère exceptionnel.

3°) Marquages anti-enképhaline autour de l'hypothalamus (Fig. 18, p.143)

L'abondante innervation enképhalinergique de l'hypothalamus basal peut être d'origine autochtone mais peut également provenir de régions adjacentes connues pour avoir des connexions avec l'hypothalamus. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés non seulement à l'hypothalamus, mais également aux aires avoisinantes, telles que l'aire septopréoptique, le pallidum, le thalamus.

a) Dans le septum

Dans cette région du télencéphale, les marquages anti-enképhaline sont limités aux aires latéro-dorsales situées au voisinage des ventricules latéraux (Pl. XLII, A et B). Le septum médian est dépourvu de marquage.

La réaction intéresse des neurones de grande taille, arrangés en un volumineux noyau de forme oblongue (Pl. XLII, A et B). Les péricaryons possèdent de très forts troncs dendritiques. Le marquage est toujours situé en périphérie du cytoplasme si bien que, lorsque la réaction est faible ou lorsque la révélation de la peroxydase n'est pas poussée, il peut paraître péricellulaire. Cependant dans des conditions normales d'observation (fond de la préparation demeurant clair), les neurones sont bien révélés par un marquage cytoplasmique laissant la zone nucléaire exempte de précipité (Pl. XLII, E). Dans toute la région septale immunoréactive, les fibres nerveuses à l'aspect en grains de chapellet ou les images pouvant évoquer des terminaisons, sont très rares.

Les comparaisons effectuées sur une même coupe par marquages successifs montrent que les péricaryons septaux réagissant aux anti-enképhaline ne fixent jamais les anti-somatostatine (Pl. XLII, B et C).

b) Dans le noyau accumbens et le lit de la strie terminale

Dans le noyau accumbens, se distribuent un certain nombre de fibres réagissant aux anti-enképhaline, ainsi que quelques péricaryons parvocellulaires mais, aucun arrangement particulier n'a été constaté.

Par contre, dans la région du lit de la strie terminale une forte concentration de terminaisons nerveuses est observée. Ces fibres semblent entourer des éléments non immunoréactifs dont certains pourraient être des péricaryons. De plus, sur coupes frontales, les terminaisons apparaissent toujours groupées en deux larges amas de section sensiblement circulaire. Un premier amas, en position haute, est plaqué contre le bord externe de la base du ventricule latéral. Le second, plus bas, mieux circonscrit, présente une densité en terminaisons beaucoup plus forte (Pl. XLII, D). Dans la région du lit de la strie terminale, une riche innervation enképhalinergique semble donc intéresser des neurones dont la nature reste à déterminer.

c) Dans l'aire préoptique

Sous l'aire septale, dans une région regroupant la partie verticale des noyaux des bandelettes diagonales de Broca et l'aire préoptique médiane, les anti-enképhaline révèlent des fibres nerveuses et des péricaryons parvocellulaires (Pl. XLII, F) qui n'adoptent aucune disposition remarquable. Dans la portion basale de l'aire préoptique, devant le chiasma optique, dans la substance perforée, des neurones magnocellulaires réagissent de façon modérée mais nette aux anti-enképhaline. Nos vérifications ont montré que ces cellules ne sont marquées ni par les anti-neurophysine, ni par les anti-somatostatine. Au total, dans la région préoptique, seuls quelques neurones parvocellulaires situés tout près du ventricule, réagissent à la fois aux anti-enképhaline et aux anti-somatostatine. Ces neurones peuvent être considérés comme faisant partie de la population périventriculaire à somatostatine.

F I G U R E 18

Marquages anti-enképhaline dans le septum, l'aire préoptique et l'hypothalamus du Cobaye. Schémas d'après POULAIN (1974). Les hachures symbolisent les fibres et terminaisons nerveuses et les péricaryons immunoréactifs sont représentés par les petits cercles noirs.

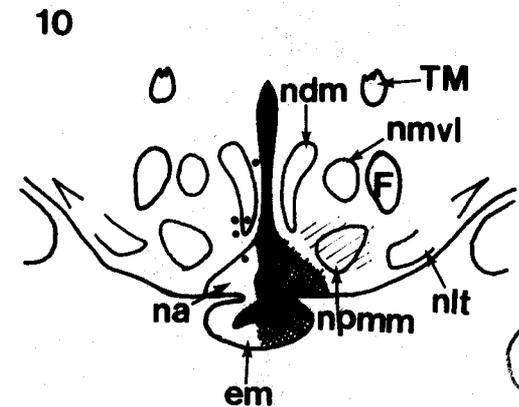
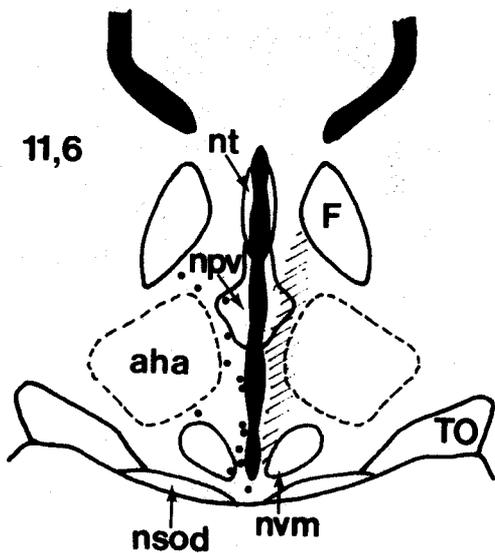
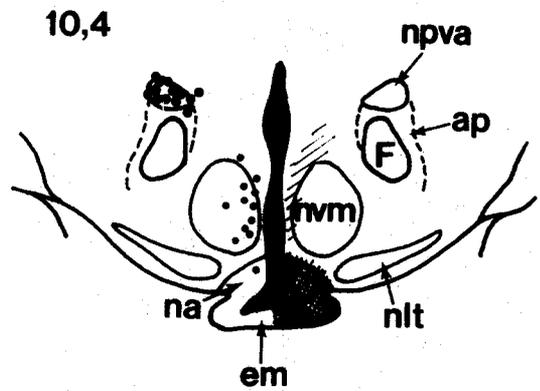
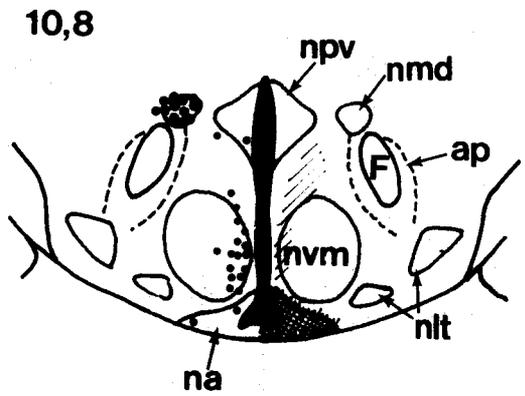
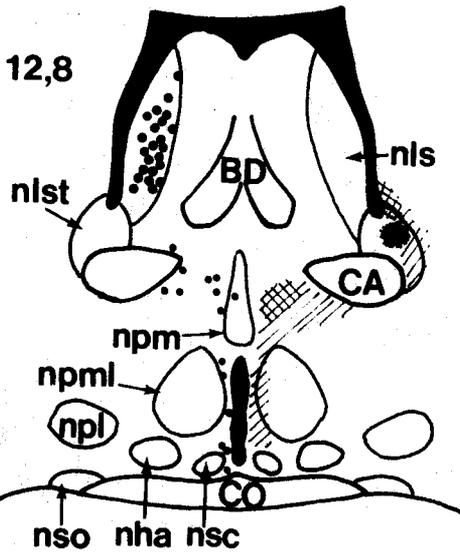
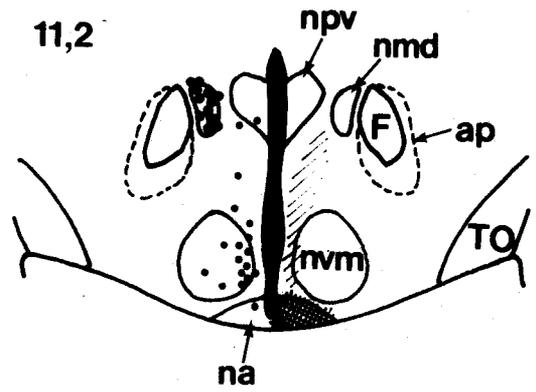
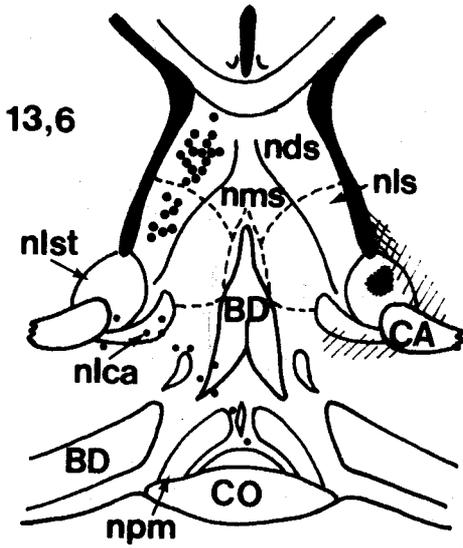
Sur chaque figure, le nombre indique en millimètres la distance séparant le plan de coupe, du plan de référence.

- ✓ aha : aire préoptique antérieure
- ✓ ap : aire périfornicale
- ✓ BD : bandelettes diagonales de Broca
- ✓ CA : commissure antérieure
- ✓ CO : chiasma optique
- ✓ em : éminence médiane
- ✓ F : fornix
- ✓ na : noyau arqué
- ✓ ndm : noyau dorsomédian
- nds : noyau dorsal du septum
- nha : noyau hypothalamique antérieur
- ✓ nlca : noyau du lit de la commissure antérieure
- nls : noyau latéral du septum
- ✓ nlst : noyau du lit de la strie terminale
- nlt : noyau latéral du tuber
- nmd : noyau magnocellulaire dorsal
- ✓ nms : noyau médian du septum
- nmvl : noyau magnocellulaire ventrolatéral
- npl : noyau préoptique latéral
- ✓ npm : noyau préoptique médian
- ✓ npml : noyau préoptique médial
- ✓ npmm : noyau prémamillaire
- ✓ npv : noyau paraventriculaire
- npva : noyau paraventriculaire accessoire
- ✓ nsc : noyau suprachiasmatique
- ✓ nso : noyau supraoptique
- nsod : noyau supraoptique diffus
- nt : noyau triangulaire
- ✓ nvm : noyau ventromédian
- TM : tractus mamillothalamique
- ✓ TO : tractus optique

 DENSE

 MODÉRE

 FAIBLE



BUS LILLE

d) Dans le *globus pallidus*

Cette région des corps striés présente un marquage anti-enképhaline important et extrêmement caractéristique. Il n'a en effet rien de comparable avec ceux des aires hypothalamique, septale et préoptique, puisque ni corps cellulaires, ni terminaisons nerveuses n'y réagissent. La réaction est exclusivement située sur de larges faisceaux de fibres (Pl. XLII, G). Le *globus pallidus* est donc vraisemblablement une région de transit pour des axones contenant des enképhalines mais, l'origine et la destination de tels axones restent à déterminer.

Dans le reste des corps striés (noyau caudé et putamen) aucune autre structure ne montre d'immunoréactivité anti-enképhaline. Il faut cependant préciser que seule la partie rostrale des corps striés a été étudiée dans ce travail.

e) Dans le thalamus

Dans la partie médiane de l'habenula et du thalamus dorsal (noyau parataenial, strie médullaire et noyau thalamique paraventriculaire), des fibres nerveuses et des péricaryons épars sont marqués par les anti-enképhaline. Nous n'y avons pas observé d'arrangement particulier des structures immunoréactives.

C - DISCUSSION

Nos résultats sur la localisation immunocytoologique des enképhalines dans le cerveau du Cobaye concordent dans leurs grandes lignes avec ceux que d'autres auteurs ont obtenus chez le Rat (ELDE et coll., 1976 ; SIMANTOV et coll., 1977 ; HOKFELT et coll., 1977 ; SAR et coll., 1978 ; WAMSLEY et coll., 1980). En effet, les zones les plus immunoréactives comme le septum, le lit de la strie terminale et surtout le *globus pallidus* sont signalées par tous les auteurs. Cependant, l'importance quantitative de l'innervation enképhalinergique que nous rapportons dans l'hypothalamus basal n'a semble-t-il pas été notée chez le Rat, sauf peut-être par SIMANTOV et coll. (1977). La présence de terminaisons dans la zone externe de l'éminence médiane a pourtant été nettement démontrée dans cette espèce (HOKFELT et coll., 1978). La localisation des enképhalines dans des fibres entourant les vaisseaux du plexus hypothalamo-hypophysaire est tout à fait compatible avec les actions modulatrices des opiopeptides endogènes sur les sécrétions hypophysaires. D'autant plus que, dans ces terminaisons les enképhalines ont une localisation granulaire, à l'image d'autres peptides hypophysiotropes dans l'éminence médiane : LH-RH (MAZZUCA, 1975 ; GOLDSMITH et GANONG, 1975), vasopressine (SILVERMAN et ZIMMERMAN, 1975), somatostatine (PELLETIER et coll., 1974). Cette localisation des enképhalines dans des granules est en accord avec un résultat récent obtenu par PICKEL et coll. (1979) montrant que la méthionine-enképhaline est contenue dans les grains de terminaisons du *locus coeruleus*. Nos observations dans l'éminence médiane conduisent à une conclusion identique, mais la méthode immunohistochimique avant enrobage suggère en plus une localisation sur les petites vésicules de type synaptique. Cependant il faut dire que, lorsqu'elle est employée, cette méthode induit des marquages extragranulaires lors, par exemple, de la détection des hormones élaborées par les cellules antéhypophysaires (BEAUVILLAIN, 1978). En conséquence, pour qu'intéressantes que puissent être ses implications, cette observation doit être considérée avec prudence car elle pourrait tout simplement être liée à une mauvaise conservation des granules provoquant la diffusion du peptide dans toute la terminaison.

La localisation en microscopie photonique de l'immunoréactivité anti-enképhaline dans les terminaisons nerveuses contenant la somatostatine facteur inhibiteur de la sécrétion de GH hypophysaire (BRAZEAU et coll., 1973) constitue une observation originale qui suscite de nombreuses questions.

La première concerne la situation subcellulaire relative des deux peptides. La microscopie électronique montre que chacun d'entre eux est situé dans des granules de taille analogue et que, dans une terminaison donnée, tous les granules sont marqués. La comparaison de coupes ultrafines adjacentes qui pourrait peut être donner un résultat direct, n'a pas été faite. Cependant, si l'on rapproche les résultats de microscopie photonique montrant que somatostatine et enképhaline sont dans les mêmes terminaisons, de ceux de microscopie électronique localisant chacun des peptides dans tous les granules d'une même terminaison, on ne peut que conclure à leur présence simultanée dans le même granule. L'interprétation la plus simple d'un tel fait, serait que les deux peptides sont élaborés ensemble par le neurone à somatostatine situé dans la zone périventriculaire antérieure et qui, d'après KRISCH (1978) envoie son axone dans l'éminence médiane. Cependant, lorsque l'on tient compte de l'effet stimulant des enképhalines sur la fonction GH hypophysaire (Chapitre 2, III, C, 4°) on conçoit mal que deux peptides dont les effets sur la sécrétion d'une hormone sont contraires, soient contenus dans un même grain donc libérés vraisemblablement de façon concomitante. Dans ces conditions, la modulation de la sécrétion de GH ne pourrait être fonction que de la proportion relative de chacun des deux facteurs dans le grain. D'autre part, certaines de nos observations ne plaident pas en faveur de la synthèse d'enképhaline par le neurone à somatostatine. En effet, toujours d'après KRISCH (1978) les péricaryons périventriculaires qui élaborent cette hormone hypothalamique sont à l'origine des terminaisons de l'éminence médiane, mais également de celles du noyau ventromédian. Or, nous montrons que dans ce noyau, les terminaisons somatostatinerigiques ne contiennent pas d'enképhaline, différant ainsi de celles de l'éminence médiane. De plus, des comparaisons que nous avons effectuées entre marquages anti-enképhaline et anti-somatostatine des péricaryons périventriculaires, il ressort que les deux peptides ne sont pas toujours présents ensemble.

Au total, il nous semble que le fait de la coexistence enképhaline-somatostatine puisse être rapproché de celui de la localisation d'enképhaline dans les cellules gonadotropes et thyrotropes hypophysaires dans

lesquelles l'éventualité d'une synthèse de la séquence 61-65 β -LPH est peu probable. En effet, si la présence d'enképhalines dans les grains de sécrétion hypophysaires et leur action inhibitrice sur LH, FSH et TSH ont un rapport de cause à effet, on peut penser qu'il en est de même pour les neurones hypothalamiques élaborateurs de somatostatine. L'hypothèse d'une inhibition de la sécrétion de somatostatine par les enképhalines est parfaitement compatible avec leur effet stimulateur sur la GH hypophysaire. Par ailleurs, la présence d'enképhaline dans les terminaisons somatostatinerigiques chez tous les animaux étudiés suggérerait un effet permanent sur le taux basal de somatostatine.

Dans son ensemble, cette interprétation concorde avec les résultats d'autres auteurs qui pensent que l'action stimulante des enképhalines sur GH s'exerce au niveau hypothalamique (BRUNI et coll., 1977 ; COCCHI et coll., 1977 ; SHAAR et coll., 1977). Cependant, l'action pharmacologique de la morphine et des peptides morphinomimétiques ne semble pas devoir toujours faire intervenir la somatostatine (LIEN et coll., 1978 ; CHIHARA et coll., 1978) et comme le suggèrent LIEN et coll., (1978), plusieurs voies différentes pourraient être impliquées.

Dans les zones plus internes de l'éminence médiane, les nombreuses fibres marquées par les anti-enképhaline ne réagissent pas aux anti-somatostatine et cette constatation souligne encore le particularisme des terminaisons qui, dans la zone externe contiennent les deux peptides. De plus, les deux types de fibres, ne paraissent pas réagir de la même façon au traitement par la colchicine. Les terminaisons de la zone externe ne sont pas affectées alors que dans la zone interne, ce traitement se traduit par une intensification de l'immunoréactivité. Par dosages, BAYON et coll. (1980) montrent également une augmentation des enképhalines hypothalamiques après colchicine. La raison de telles modifications demeure obscure, si l'on s'en tient à l'interprétation de l'action de la colchicine, selon laquelle la drogue, en provoquant l'interruption du flux axonal, conduirait à une accumulation du produit de sécrétion dans la région du péricaryon.

Les fibres de la zone interne montrent une particularité supplémentaire, en établissant de nombreux et étroits contacts avec les prolongements des épendymocytes. Des relations analogues entre tancytes et fibres à LH-RH ont été récemment décrites (NOZAKI et coll., 1979) mais il semble que les contacts entre fibres contenant des enképhalines d'une part, et prolongements gliaux d'autre part, soient plus nombreux. Dans l'éminence médiane, les

épendymocytes réalisent une liaison anatomique entre le liquide céphalorachidien et le sang des vaisseaux du plexus porte, de sorte que plusieurs théories les ont fait intervenir dans d'hypothétiques phénomènes d'échange entre l'un et l'autre (voir PILGRIM, 1978). Le rôle même des tancytes demeurant assez énigmatique, il est donc difficile d'apprécier la signification fonctionnelle des contacts qu'ils peuvent avoir avec les fibres peptidiques en général (SCOTT et PAULL, 1979) et à enképhaline en particulier.

Se pose ensuite la question de l'origine des fibres qui, dans tout l'hypothalamus médiobasal et l'éminence médiane, réagissent aux anti-enképhaline.

Exception faite des terminaisons somatostatinerigiques, il semble que ces fibres puissent trouver leur origine dans l'une quelconque des concentrations de péricaryons immunoréactifs que nous avons décrites. Les régions septopréoptiques où de nombreux corps cellulaires marqués sont présents, sont en effet en connexion avec le noyau arqué et l'éminence médiane (POULAIN et PARTOUCHE, 1973 ; POULAIN, 1977, 1979). En conséquence, il n'est pas exclu que les neurones magnocellulaires fortement marqués dans les aires latérale et dorsale du septum projettent vers l'éminence médiane. Chez le Rat, SAR et coll. (1978) mettent en doute la nature péricaryale des structures immunoréactives dans cette région et pensent qu'il s'agirait plutôt de terminaisons nerveuses entourant des corps cellulaires. Chez le Cobaye, lorsque la réaction est volontairement modérée, on obtient effectivement un tel aspect, mais il semble que ce soit en raison de la disposition périphérique préférentielle des organites immunoréactifs du cytoplasme. Ce marquage n'est en aucun cas comparable à celui qui caractérise le lit de la strie terminale où les fibres immunoréactives dessinent le contour de cellules (Pl. XLII). Chez le Rat encore, d'autres auteurs (HOKFELT et coll., 1977 ; WAMSLEY et coll., 1980) concluent comme nous, à l'existence dans le septum latéral de péricaryons contenant des enképhalines. Cette conclusion est en outre en accord avec des résultats obtenus par d'autres méthodes. En effet, des taux importants d'enképhalines sont relevés dans cette région par dosages radioimmunologiques (ROSSIER et coll., 1977) alors que de très faibles taux de sites récepteurs aux opiacés y sont notés par ATWEH et KUHAR (1977 b). Confrontées, ces observations ne sont pas en faveur d'un site présynaptique des enképhalines septales, donc de leur présence dans des terminaisons d'axones, mais suggèrent plutôt leur localisation dans des péricaryons.

Les neurones parvocellulaires réagissant aux anti-enképhaline dans la région préoptique et l'hypothalamus pourraient également envoyer leurs axones vers l'infundibulum. Cette hypothèse concernerait tout particulièrement les péricaryons groupés dans le noyau hypothalamique ventromédian. En effet, on sait que d'une part ce noyau envoie des axones dans l'éminence médiane (KRIEGER M.S. et coll., 1977) et que d'autre part, il intervient directement dans la régulation de la GH hypophysaire (voir MARTIN, 1976).

Le noyau magnocellulaire situé dans l'hypothalamus dorsal représente également une très plausible origine pour les fibres à enképhaline de l'hypothalamus basal. Une relation directe entre l'éminence médiane et cette région est démontrée par transport rétrograde de peroxydase (POULAIN, 1979). Il semble que chez le Rat, ce noyau soit moins bien délimité. HOKFELT et coll. (1977) et SAR et coll. (1978) signalent la présence de péricaryons immunoréactifs dans l'aire périfornicale mais n'y décrivent aucune concentration particulière. Tout récemment, WAMSLEY et coll. (1980) décrivent dans tout l'hypothalamus dorsal du Rat, un système diffus de neurones à enképhaline. Les grands péricaryons fusiformes qu'ils observent autour du fornix pourraient bien correspondre à ceux qui, chez le Cobaye, sont regroupés en un noyau bien délimité.

La voie périventriculo-infundibulaire à somatostatine exceptée, les systèmes peptidergiques connus ne paraissent avoir que de rares points communs avec le système utilisant les enképhalines. ROSSIER et coll. (1979) suggèrent que des neurones du noyau paraventriculaire peuvent innerver le lobe nerveux de l'hypophyse. Personnellement, nous avons effectivement observé quelques fibres à enképhaline dans le lobe nerveux du Cobaye, mais dans les noyaux paraventriculaire et supraoptique, les marquages cellulaires sont toujours restés exceptionnels. C'est aussi ce qui ressort des observations de SAR et coll. (1978) et de WAMSLEY et coll. (1980) pour ce qui concerne les péricaryons magnocellulaires à compétence neurohypophysaire.

Pour conclure, on doit remarquer que la distribution des enképhalines dans l'hypothalamus et les régions avoisinantes présente des aspects morphologiques variés. Cette diversité cadre bien avec les multiples

potentialités des pentapeptides (voir FREDERICKSON, 1977 et BEAUMONT et HUGHES, 1979) et avec leurs nombreux sites d'action démontrés par microiontophorèse (CARETTE et POULAIN, 1978, voir aussi NORTH, 1979).

Nous retiendrons tout particulièrement leur implication dans les mécanismes neuro-endocrines hypophysiotropes, suggérée par leur présence dans le système somato-statinergique et dans des fibres qui établissent des contacts avec les tanocytes.

L'ensemble des résultats concernant la localisation des enképhalines dans l'hypothalamus et les régions encéphaliques voisines, a fait l'objet d'un article actuellement sous presse (TRAMU et coll., 1980 - à paraître Brain Res. 1981).

III - C O N C L U S I O N S

Par des méthodes immunomorphologiques, nous démontrons la présence de nombreux peptides chimiquement apparentés à l'ACTH et à la β -LPH dans le diencéphale du Cobaye. Les déterminants peptidiques sont détectés dans plusieurs systèmes de neurones qui sont en rapport étroit avec l'hypothalamus et tout particulièrement avec la région infundibulaire. Si l'on prend cette région comme référence, il est possible de parvenir à une définition, au moins partielle, de quatre systèmes qui utilisent ces peptides. Le premier a un point de départ infundibulaire alors que pour les trois autres l'infundibulum est une zone de projection.

- 1 - Système "infundibulofuge" où, à l'exception des enképhalines, toutes les séquences peptidiques détectées par ailleurs dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse (ACTH, α -MSH, endorphines), sont présentes. Les péricaryons de ce système sont localisés dans l'hypothalamus médiobasal. Les projections ne sont pas complètement définies. Elles paraissent cependant nombreuses et essentiellement extrahypothalamiques.
- 2 - Système "infundibulopète" à LH-RH, dont la voie préoptico-infundibulaire est très bien décrite (voir BARRY, 1979). Dans ce système, nous démontrons la présence de déterminants apparentés aux fragments C-terminaux des molécules d'ACTH (peut-être le CLIP) et de β -LPH (la β -endorphine).
- 3 - Système "infundibulopète" à somatostatine, dont la voie périventriculo-infundibulaire contient des déterminants enképhaline, surtout dans sa portion terminale arrivant au contact des capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire.
- 4 - Système "infundibulopète" à enképhaline. Nous le définissons essentiellement par ses terminaisons qui se répartissent dans l'hypothalamus médiobasal et l'éminence médiane interne et paraissent établir de nombreuses relations avec les épendymocytes. Il est difficile de se prononcer sur l'origine cellulaire de ces terminaisons. Les péricaryons décrits dans l'hypothalamus dorsal et la région septale représentent deux des sources les plus probables.

Jusqu'à présent, la signification fonctionnelle de la présence de ces peptides dans des neurones en rapport avec la région infundibulaire, ne peut donner lieu qu'à des hypothèses dont la vérification nécessitera la mise en oeuvre de méthodologies complémentaires.

DISCUSSION et CONCLUSION GENERALES

Les résultats de la première partie de ce travail, qui traite de l'identification des sites hypophysaires d'élaboration des hormones polypeptidiques et peptides apparentés, peuvent être analysés en fonction des concepts actuels sur cette sécrétion pituitaire.

Selon des données expérimentales récentes, ces hormones sont élaborées par la cellule sous forme d'un précurseur glycoprotéique dont l'existence a pu être démontrée aussi bien dans la cellule corticotrope du lobe antérieur que dans la cellule du lobe intermédiaire. Dans une même cellule, la localisation simultanée de séquences aussi différentes que, ACTH, β -MSH et β -endorphine (cas de la cellule corticotrope du Lérot) ou que, ACTH, α -MSH et β -endorphine (cas de la cellule du lobe intermédiaire du Cobaye), est en accord avec l'hypothèse d'un précurseur dont le clivage enzymatique donnerait naissance à plusieurs entités peptidiques possédant des fonctions précises. La nature des peptides diffère légèrement suivant le lobe où ils sont élaborés, ce qui témoignerait soit de l'existence de deux précurseurs, soit de celle d'un seul précurseur dont le clivage se ferait différemment dans chacun des deux lobes de l'adénohypophyse. En dépit des larges analogies chimiques de leur produit de sécrétion, la cellule corticotrope et la cellule du lobe intermédiaire, représentent donc bien deux types cellulaires distincts ainsi que le suggère leur répartition topographique différente. La singularité de la cellule du lobe intermédiaire se traduit essentiellement par l'élaboration d' α -MSH. Si bien qu'après la caractérisation du CLIP dans ce même lobe, une théorie a pris naissance, qui tend à justifier la présence d'ACTH dans le lobe intermédiaire par le rôle de précurseur qu'il jouerait pour l' α -MSH (proche du 1-13ACTH) et pour le CLIP (identique au 18-39ACTH).

Chez le Cobaye, nos observations pourraient confirmer cette hypothèse alors que chez le Lérot, elles l'infirmieraient, puisque dans cette espèce, α -MSH et 17-39ACTH ne coexistent jamais dans une même cellule. Pour le moment, il est difficile d'établir si la cellule à α -MSH du Lérot constitue une exception en raison de ses particularités ou, si au contraire, ce sont ces particularités mêmes qui révèlent une règle générale.

Nous rapportons par ailleurs l'absence d'immunoréactivité anti- β -MSH dans l'hypophyse du Cobaye. Bien qu'elle puisse donner un support morphologique aux doutes exprimés par certains auteurs sur l'existence de l'entité fonctionnelle β -MSH, cette absence demeure peu compatible avec l'hypothèse probablement exacte du clivage enzymatique de la portion C-terminale de β -LPH, résultant en l'apparition de β -endorphine. La singulière absence de fixation des anti- β -MSH chez le Cobaye demande donc à être précisée.

Les réactions dirigées contre l'heptapeptide commun à l'ACTH et aux MSH n'intéressent qu'une partie des cellules élaborant ces hormones. Nos observations devront également être prolongées et comparées aux résultats obtenus par d'autres techniques pour examiner l'hypothèse d'une éventuelle existence d'un peptide proche du 4-10ACTH.

C'est ce travail qui rapporte pour la première fois la localisation des enképhalines dans trois types cellulaires de l'adénohypophyse. L'essai d'interprétation de ces observations nous amène à émettre des hypothèses qui ne pourront définitivement être vérifiées ou écartées qu'après intégration de résultats provenant d'approches différentes de la question. La méthodologie des cultures cellulaires, en particulier y contribuera certainement beaucoup. Nos résultats montrent que les enképhalines sont présentes dans les grains de sécrétion des cellules corticotropes, gonadotropes et thyrotropes. En raison de cette situation, nous ne pouvons pas éliminer la possibilité de leur synthèse par ces cellules, et suggérons même une telle interprétation pour ce qui concerne les cellules corticotropes. Nous estimons cependant peu probable que les marquages anti-enképhaline des cellules gonadotropes et thyrotropes signalent des sites de synthèse, mais nous pensons qu'ils visualisent plutôt la fixation d'enképhaline sur des sites récepteurs. Selon les données de la littérature, il est en effet tout à fait vraisemblable que les cellules gonadotropes et thyrotropes possèdent de tels récepteurs puisque leurs sécrétions sont susceptibles d'être directement modulées par les enképhalines. De plus, la localisation de ces peptides dans des terminaisons nerveuses de l'éminence médiane, est compatible avec leur rôle de substances hypophysiotropes et donc également avec leur fixation sur des sites récepteurs hypophysaires.

Dans la deuxième partie qui traite des répartitions hypothalamiques de polypeptides apparentés au précurseur adénohypophysaire, nos conclusions indiquent que la présence des enképhalines dans l'éminence médiane ne paraît pas devoir être considérée seulement comme celle d'un neuropeptide destiné à être libéré dans le plexus porte pour agir sur l'hypophyse. En effet, leur localisation dans les terminaisons (et vraisemblablement dans les grains) contenant la somatostatine, repose, semble-t-il, le problème que posait leur localisation dans les grains des cellules thyrotropes et gonadotropes : site de synthèse ou site récepteur ? L'effet stimulant des enképhalines sur la fonction GH hypophysaire, effet qui d'après les données bibliographiques s'exerce au niveau hypothalamique, conforte plutôt la deuxième possibilité. Dans ces conditions les enképhalines pourraient, par exemple, exercer une action freinatrice sur la libération du granule à somatostatine. Nous montrons également que dans l'éminence médiane et l'hypothalamus médiobasal, les enképhalines sont présentes dans des terminaisons morphologiquement associées aux épendymocytes et à leurs prolongements, et ne contenant pas de somatostatine. Cette observation évoque la question d'une éventuelle intervention des tanocytes dans les processus neuroendocrines.

Dans des aires encéphaliques connues pour leurs connexions directes avec la région infundibulaire, nous décrivons plusieurs groupes de péricaryons fixant les anti-enképhaline et pouvant donc être à l'origine des terminaisons enképhalinerigiques de l'hypothalamus médiobasal. Des péricaryons magnocellulaires groupés en un noyau bien circonscrit de l'hypothalamus dorsal pourraient en être la source la plus probable. Mais des destructions électrolytiques et des désafférentations devront être pratiquées pour résoudre ce problème.

La localisation d'ACTH, MSH et endorphines dans l'éminence médiane et l'hypothalamus diffère de celle des enképhalines par plusieurs de ses aspects. Topographiquement tout d'abord puisque dans l'éminence médiane, ce sont les terminaisons à LH-RH qui contiennent des déterminants qui leur sont antigéniquement apparentés. Cette localisation particulière n'est cependant montrée que pour l'ACTH C-terminal et la β -endorphine, à l'exclusion de l'ACTH N-terminal, de l' α et β -MSH et de l' α -endorphine. Là encore, la distribution péricapillaire de ces deux peptides suggère leur rôle hypophysiotrope. Peu de données bibliographiques sont disponibles sur ce rôle mais il semble cependant que la sécrétion prolactinique puisse être concernée. Nous nous proposons d'approfondir la signification de la présence simultanée de trois peptides (LH-RH, ACTH C-terminal et β -endorphine) dans une même terminaison nerveuse, et surtout dans un même granule comme le prouve un

récent travail effectué en collaboration avec J.C. BEAUVILLAIN et le Dr. DUBOIS. L'autre localisation hypothalamique des peptides apparentés à ACTH, MSH et endorphines diffère aussi de celle des enképhalines. Chez le Cobaye, nos résultats confirment ceux que d'autres auteurs avaient obtenus chez l'Homme et le Rat, sur l'existence d'un système de neurones dont les péricaryons sont exclusivement localisés dans l'hypothalamus médiobasal et dont les projections se font vers l'organe vasculaire de la lame terminale et surtout vers des régions extrahypothalamiques. Dans les péricaryons de ce système, chez des animaux traités par la colchicine, nous avons pu caractériser tous les déterminants antigéniques du précurseur polypeptidique synthétisé par la cellule du lobe intermédiaire de l'hypophyse. L'origine et la fonction des peptides véhiculés par ce système de neurones restent à déterminer.

En conclusion, par des résultats immunohistochimiques, ce travail apporte un certain nombre de données concernant la localisation des substances polypeptidiques pituitaires dans l'appareil hypothalamo-hypophysaire. Dans l'hypothalamus, les méthodes de détection employées permettent de mettre en évidence d'étroites relations anatomiques entre les systèmes de neurones peptidergiques, relations qui reflètent très certainement de profondes intrications fonctionnelles. Nous concluerons en dégageant trois points au sujet desquels les questions abondent. Les réponses à ces questions feront très probablement apparaître progressivement d'importantes notions nouvelles.

- 1 - L'hypophyse glandulaire possède deux catégories cellulaires élaborant au moins un type de molécule d'un précurseur d'où dérivent vraisemblablement des polypeptides dont la nature chimique est connue, mais dont la fonction périphérique (à l'exception d'ACTH) demeure imprécise (MSH, LPH, endorphines et enképhalines).
- 2 - Des polypeptides analogues sont présents dans un système de neurones de l'hypothalamus médiobasal. La situation de ces neurones évoque, sans bien sûr la prouver, la possibilité d'une relation entre la cellule hypophysaire (au moins celle du lobe intermédiaire) et eux-mêmes. La sécrétion pituitaire peut-elle parvenir au neurone ou au contraire, comme le suggèrent plusieurs travaux, le péricaryon du neurone est-il capable de synthétiser le précurseur polypeptidique ? Dans cette hypothèse ou dans celle d'une origine hypophysaire, quel est le rôle de ce précurseur ?

3 - Certains de ces polypeptides, comme l'ACTH C-terminal, la β -endorphine et les enképhalines sont présents dans d'autres systèmes de neurones dont deux sont déjà caractérisés par ailleurs (LH-RH et somatostatine). Ces localisations remarquables suggèrent pour ces peptides, d'importantes fonctions neuroendocrines et tout particulièrement hypophysiotropes. En outre, les neurones qui les renferment sont-ils responsables de leur synthèse ou, pourrait-on imaginer qu'ils ont la possibilité de les "capter" ?

B I B L I O G R A P H I E

- ABE K., ISLAND D.P., LIDDLE G.W., FLEISCHER N. et NICHOLSON W.E. (1967) : Radioimmunologic evidence for α -MSH in human pituitary and tumor tissues. J. Clin. Endocrinol. Metab. 27, 46-52.
- ABE K., NICHOLSON W.E., LIDDLE G.W., ORTH D.N. et ISLAND D.P. (1969) : Normal and abnormal regulation of β -MSH in man. J. Clin. Invest. 48, 1580-1585.
- ALLEN R.G., HERBERT E., HINMAN M., SHIBUYA H. et PERT C.B. (1978) : Coordinate control of corticotropin, β -lipotropin and β -endorphin release in mouse pituitary cell cultures. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 4972-4976.
- ATWEH S.F. et KUCHAR J. (1977 a) : Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Spinal cord and medulla. Brain Res. 124, 53-67.
- ATWEH S.F. et KUCHAR J. (1977 b) : Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. II. The brain stem. Brain Res. 129, 1-12.
- ATWEH S.F. et KUCHAR J. (1977 c) : Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. III. The telencephalon. Brain Res. 134, 393-405.
- AUSTEN B.M., SMYTH D.G. et SNELL C.R. (1977) : γ -endorphin, α -endorphin and met-enkephalin are formed extracellularly from lipotropin C fragment. Nature 269, 619-621.
- BACHELOT I., WOLFSEN A.R. et ODELL W.D. (1976) : La béta MSH 1-22 plasmatique. Un artéfact? Ann. Endocrinol. 37, 453-454.
- BACHELOT I., WOLFSEN A.R. et ODELL W.D. (1977) : Pituitary and plasma lipotropins : demonstration of the artefactual nature of β -MSH. J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 939-946.
- BAKER B.L. et DRUMMOND T. (1972) : The cellular origin of corticotropin and melanotropin as revealed by immunochemical staining. Amer. J. Anat. 134, 395-409.
- BAKER B.L., PEK S., MIDGLEY A.R. et GERSTEN B.E. (1970) : Identification of the corticotroph cell in rat hypophysis with peroxidase-labeled antibody. Anat. Rec. 166, 557-567.
- BARGMANN W., LINDNER E. et ANDRES K.H. (1967) : Über Synapsen an endokrinen Epithelzellen und die Definition sekretorischer Neurone. Untersuchungen am Zwischenlappen der Katzenhypophyse. Z. Zellforsch. 77, 282-298.
- BARNEA A., OLIVER C. et PORTER J.C. (1977) : Subcellular localization of α -melanocyte-stimulating hormone in the rat hypothalamus. J. Neurochem. 29, 619-624.
- BARRY J. (1976) : Characterization and topography of LH-RH neurons in the human brain. Neurosci. Lett. 3, 287-291.
- BARRY J. (1978) : The distribution, organization and connections of neurons containing luteinizing hormone releasing hormone in the vertebrate brain. In : Biologie cellulaire des processus neurosécrétoires hypothalamiques. pp. 399-413. (Eds; J.D. VINCENT et C. KORDON). Editions du CNRS, Paris.
- BARRY J. (1979) : Immunohistochemistry of luteinizing hormone-releasing hormone producing neurons of the vertebrates. Int. Rev. Cytol. 60, 179-221.

- BARRY J., DUBOIS M.P. et POULAIN P. (1973 a) : LRF-producing cells of the mammalian hypothalamus : a fluorescent antibody study. Z. Zellforsch. 146, 351-366.
- BARRY J., DUBOIS M.P., POULAIN P. et LEONARDELLI J. (1973 b) : Caractérisation et topographie des neurones hypothalamiques immunoréactifs avec des anticorps anti-LRF de synthèse. C. R. Acad. Sci. Paris 276, 3191-3193.
- BARRY J. et LEONARDELLI J. (1968) : Etude comparée des neurones et des fibres monoaminergiques de la région tubéro-infundibulaire chez le cobaye mâle normal ou castré. C. R. Acad. Sci. Paris 266, 15-18.
- BAYON A., KODA L., BATTENBERG E. et BLOOM F.E. (1980) : Redistribution of endorphin and enkephalin immunoreactivity in the rat brain and pituitary after in vivo treatment with colchicine or cytochalasin B. Brain Res. 183, 103-111.
- BEAUMONT A. et HUGHES J. (1979) : Biology of opioid peptides. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 19, 245-267.
- BEAUVILLAIN J.C. (1978) : Caractérisation à l'échelle ultrastructurale des cellules adénohypophysaires individualisées par différentes techniques immunocytochimiques (Etude chez le cobaye et le lérot). Thèse Science, Université de Lille, n° 423, p. 1-113.
- BEAUVILLAIN J.C. et TRAMU G. (1973) : Cellules à activité corticotrope de l'hypophyse de lérot (*Eliomys quercinus*) : superpositions des résultats de microscopie optique (immunofluorescence et colorations) et de microscopie électronique. C. R. Acad. Sci. Paris 277, 1025-1028.
- BEAUVILLAIN J.C., TRAMU G. et CROIX D. (1980) : Electron microscopic localization of enkephalin in the median eminence and the adenohypophysis of the guinea-pig. Neuroscience 5, 1705-1716.
- BEAUVILLAIN J.C., TRAMU G. et DUBOIS M.P. (1974) : Individualisation ultrastructurale des cellules gonadotropes et corticotropes de l'antéhypophyse du lérot et du cobaye par superposition de microscopie optique et de microscopie électronique. J. Microscopie. 20, 20A.
- BEAUVILLAIN J.C., TRAMU G. et DUBOIS M.P. (1975) : Characterization by different techniques of adrenocorticotropin and gonadotropin producing cells in lerot pituitary (*Eliomys quercinus* L.). Cell Tissue Res. 158, 301-317.
- BEGEOT M., DUBOIS M.P. et DUBOIS P.M. (1978 a) : Localisation par immunofluorescence de l'hormone β -lipotrope (β -LPH) et de la β -endorphine dans l'antéhypophyse de foetus humains normaux et anencéphales. C. R. Acad. Sci. Paris 286, 213-215.
- BEGEOT M., DUBOIS M.P. et DUBOIS P.M. (1978 b) : Immunologic localization of α - and β -endorphins and β -lipotropin in corticotrophic cells of the normal and anencephalic fetal pituitaries. Cell Tiss. Res. 193, 413-422.
- BELOFF-CHAIN A., NEWMAN M.E. et MANSFORD K.R. (1977) : Factors influencing insulin and glucagon secretion in lean and genetically obese mice. Horm. Metab. Res. 9, 33-37.

BENDA C. (1901) : Die mikroskopische Befunde bei vier Fällen von Akromegalie. Med. Wschr. 17, 537-539. Cité par GIROD (1976).

BERAUD G. (1977) : Evolution suivant l'âge et le sexe, de l'ACTH des pars distalis et neurointermedia de l'hypophyse de rats. C. R. Acad. Sci. Paris 284, 377-380.

BERGLAND R.M. et PAGE R.B. (1978) : Can the pituitary secrete directly to the brain ? (Affirmative anatomical evidence). Endocrinology 102, 1325-1338.

BERGLAND R.M. et PAGE R.B. (1979) : Pituitary-brain vascular relations : a new paradigm. Science 204, 18-24.

BERGROTH V., REITAMO S., KONTTINEN Y.T. et LALLA M. (1980) : Sensitivity and non specific staining of various immunoperoxidase techniques. Histochemistry 68, 17-22.

BIRK Y. et LI C.H. (1964) : Isolation and properties of a new biologically active peptide from sheep pituitary glands. J. Biol. Chem. 239, 1048-1052.

BJORKLUND A., FALK B., HROMEK F., OWMAN C. et WEST K.A. (1970) : Identification and terminal distribution of the tubero-hypophyseal monoamine fibre systems in the rat by means of stereotaxic and microspectrofluorimetric techniques. Brain Res. 17, 1-23.

BLANK M.S., PANERAI A.E. et FRIESEN H.G. (1979) : Opioid peptides modulate luteinizing hormone secretion during sexual maturation. Science 203, 1129-1131.

BLOCH B., BUGNON C., FELLMANN D. et LENYS D. (1978 a) : Présence de déterminants antigéniques de la β -LPH, de la β -MSH, de l' α -endorphine, de l'ACTH et de l' α -MSH dans les neurones révélés par l'anti- β -endorphine au niveau du noyau infundibulaire de l'Homme. C. R. Acad. Sci. Paris 287, 1019-1022.

BLOCH B., BUGNON C., FELLMANN D. et LENYS D. (1978 b) : Immunocytochemical evidence that the same neurons in the human infundibular nucleus are stained with anti-endorphins and antisera of other related peptides. Neurosci. Lett. 10, 147-152.

BLOCH B., BUGNON C., FELLMANN D., LENYS D. et GOUGET A. (1979) : Neurons of the rat hypothalamus reactive with antisera against endorphins, ACTH, MSH and β -LPH. Cell Tissue Res. 204, 1-15.

BLOCH B., BUGNON C., LENYS D. et FELLMANN D. (1978 c) : Description des neurones immunoréactifs à un immunosérum anti- β -endorphine présents dans le noyau infundibulaire chez l'homme. C. R. Acad. Sci. Paris 287, 309-312.

BLOOM F., BATTENBERG E., ROSSIER J., LING N. et GUILLEMIN R. (1978) : Neurons containing β -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin : immunocytochemical studies. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 1591-1595.

BLOOM F., BATTENBERG E., ROSSIER J., LING N., LEPPALUOTO J., VARGO T.M. et GUILLEMIN R. (1977) : Endorphins are located in the intermediate and anterior lobes of the pituitary gland, not in the neurohypophysis. Life Sci. 20, 43-48.

BLOOM F., SEGAL D., LING N. et GUILLEMIN R. (1976) : Endorphins : profound behavioral effects in rats suggest new etiological factors in mental illness. Science 194, 630-632.

- BOHUS B. (1979) : Effects of ACTH-like neuropeptides on animal behavior and man. Pharmacology 18, 113-122.
- BOURNAUD F., GOURDJI D., MONGONGU S. et TIXIER-VIDAL A. (1977) : (³H)-thyroliberin (TRH) binding to nuclei isolated from a pituitary clonal cell line (GH3). Neuroendocrinology 24, 183-194.
- BRADBURY A.F., SMYTH D.G., SNELL C.R., DEAKIN J.F.W. et NENDLANDT S. (1977) : Comparison of the analgesic properties of lipotropin C-fragment and stabilized enkephalins in the rat. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 748-754.
- BRAZEAU P., VALE W., BURGUS R., LING N., BUTCHER M., RIVIER J. et GUILLEMIN R. (1973) : Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. Science 179, 77-79.
- BREUSTEDT H.J. (1968) : Zur immunohistologischen ACTH Lokalisation in der Rattenhypophyse. Endokrinologie 53, 1-19.
- BROWN M.S. et GOLDSTEIN J.L. (1979) : Receptor-mediated endocytosis : insights from the lipoprotein receptor system. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 3330-3337.
- BROZMAN M. (1967) : Histochemical localization of ACTH and TSH in the human hypophysis. Acta Histochem. 26, 261-270.
- BRUNET N., GOURDJI D., TIXIER-VIDAL A., PRADELLES P., MORGAT J.L. et FROMAGEOT P. (1974) : Chemical evidence for associated TRF with subcellular fractions after incubation of intact rat prolactin cells (GH3) with (³H)-labelled TRF. FEBS Lett. 38, 129-133.
- BRUNI J.F., VAN VUGT D., MARSHALL S. et MEITES J. (1977) : Effects of naloxone, morphine and methionine-enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone. Life Sci. 21, 461-466.
- BUGNON C., BLOCH B., LENYS D. et FELLMANN D. (1979 a) : Etude cyto-immunologique chez le foetus humain et chez l'homme adulte de neurones hypothalamiques susceptibles d'élaborer divers peptides de type MSH, ACTH, LPH et endorphines à partir d'un précurseur commun. J. Physiol. Paris 75, 67-87.
- BUGNON C., BLOCH B., LENYS D. et FELLMANN D. (1979 b) : Infundibular neurons of the human hypothalamus simultaneously reactive with antisera against endorphins, ACTH, MSH and β -LPH. Cell Tissue Res. 199, 177-196.
- CARETTE B. et POULAIN P. (1978) : Inhibitory action of iontophoretically applied methionine-enkephalin and leucine-enkephalin on tuberal hypothalamic neurons. Neurosci. Lett. 7, 137-140.
- CASTEL M. (1978) : Immunocytochemical evidence for vasopressin receptors. J. Histochem. Cytochem. 26, 581-592.
- CHATELAIN A., DUBOIS M.P. et DUPOUY J.P. (1976) : Hypothalamus and cytodifferentiation of the foetal pituitary gland. Cell Tiss. Res. 169, 335-344.

- CHATELAIN A., DUBOIS M.P. et DUPOUY J.P. (1979) : Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, GH, prolactin) in the fetal hypophysis of the rat : influence of the hypothalamus. Cell Tissue Res. 196, 409-427.
- CHIHARA K., ARIMURA A., COY A. et SCHALLY A.V. (1978) : Studies on the interaction of endorphins, substance P and endogenous somatostatin in growth hormone and prolactin release in rats. Endocrinology 102, 281-290.
- CHILDS G.V., COLE D.E., KUBEK M., TOBIN R.B. et WILBER J.F. (1978) : Endogenous thyrotropin-releasing hormone in the anterior pituitary : sites of activity as identified by immunocytochemical staining. J. Histochem. Cytochem. 26, 901-908.
- CHRETIEN M., BENJANNET S., GOSSARD F., GIANOULAKIS C., CRINE P., LIS M. et SEIDAH N.G. (1979) : From β -lipotropin to β -endorphin and "pro-opio-melanocortin". Can. J. Biochem. 57, 1111-1121.
- CHRETIEN M. et LI C.H. (1967) : Isolation, purification and characterization of γ -lipotropic hormone from sheep pituitary glands. Can. J. Biochem. 45, 1163-1174.
- CICERO T.J., SCHAINKER B.A. et MEYER E.R. (1979) : Endogenous opioids participate in the regulation of the hypothalamic-pituitary-luteinizing hormone axis and testosterone negative feed-back control of luteinizing-hormone. Endocrinology 104, 1286-1291.
- COCCHI D., SANTAGOSTINO A., GIL-AD I., FERRI S. et MULLER E.E. (1977) : Leu-enkephalin stimulated growth hormone and prolactin release in the rat : comparison with the effect of morphine. Life Sci. 20, 2041-2046.
- COLLIN R. (1933) : L'hypophyse. Travaux originaux et études. 326 p. Imp. Ed. G Thomas, Nancy.
- COX B.M., GENTLEMAN S., SU T.P. et GOLDSTEIN A. (1976 a) : Further characterization of morphine-like peptides (endorphins) from pituitary. Brain Res. 115, 285-296.
- COX B.M., GOLDSTEIN A. et LI C.H. (1976 b) : Opioid activity of a peptide, β -lipotropin (61-91), derived from β -lipotropin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 1821-1823.
- COX B.M., OPHEIM K.E., TESCHEMACHER H. et GOLDSTEIN A. (1975) : A peptide like substance from pituitary that acts like morphine. Life Sci. 16, 1777-1782.
- COX B.M., ROSS M., GOLDSTEIN A. et PALMOUR R.M. (1979) : Pharmacological and immunological characterization of the leu⁵ analogue of human β -endorphin. Brain Res. 165, 311-319.
- CRUICKSHANK B. et CURRIE A.R. (1958) : Localization of tissue antigens with the fluorescent antibody technique : application to human anterior pituitary hormones. Immunology 1, 13-26.
- CUSHING H. (1932) : The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations. In : Pituitary body, hypothalamus and parasympathetic nervous system. Bailliere, Tindall et Cox, London. Cité par : RACADOT J., VILA-PORCILE E., OLIVIER L. et PEILLON F. (1975) : Electron microscopy of pituitary tumours. Progr. Neurol. Surg., 6, 95-141.

- DESSY C. et HERLANT M. (1974) : Localisation comparée des immunsérums antilipotropine, anticorticotropine et antimélanotropine β au niveau de l'hypophyse du porc. C. R. Acad. Sci. Paris 278, 1923-1926.
- DESSY C., HERLANT M. et CHRETIEN M. (1973) : Détection par immunofluorescence des cellules synthétisant la lipotropine. C. R. Acad. Sci. Paris 276, 335-338.
- DE WIED D. (1976) : Hormonal influences on motivation, learning and memory processes. Hosp. Practice 11, 123-131.
- DE WIED D. (1977) : Behavioral effects of neuropeptides related to ACTH, MSH and β -LPH. In : ACTH and related peptides : structure, regulation and action. (Eds. KRIEGER D.T. and GANONG W.T.), Ann. N. Y. Acad. Sci. 297, 263-274.
- DIXON H.B.F. (1960) : Chromatographic isolations of pig and human MSH. Biochem. Biophys. Acta 37, 38-42.
- DROUHAULT R., BETHOUS C. et BLANQUET P. (1975) : Etude in vitro de l'activité hypocalcémiant, hypophosphorémiant, hyperlipémiante et immunogène de tronçons peptidiques communs aux hormones ACTH, α et β -MSH et hormone β -lipotropique. C. R. Acad. Sci. Paris 280, 2141-2143.
- DUBOIS M.P. (1971) : Cytologie et immunocytologie de l'hypophyse des bovins (Démonstration technique). In : Fonction gonadotrope et rapports hypothalamo-hypophysaires chez les animaux sauvages. Entretiens de CHIZE, (Ed. M. HERLANT) Masson et Cie, Paris p. 225-235.
- DUBOIS M.P. (1971) : Les cellules corticotropes de l'hypophyse des bovins, ovins et porcins. Mise en évidence par immunofluorescence et caractères cytologiques. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 11, 589-624.
- DUBOIS M.P. (1972 a) : Localisation cytologique par immunofluorescence des sécrétions corticotropes, α et β mélanotropes au niveau de l'antéhypophyse des bovins, ovins et porcins. Z. Zellforsch. 125, 200-209.
- DUBOIS M.P. (1972 b) : Nouvelles données sur la localisation au niveau de l'adénohypophyse des hormones polypeptidiques, ACTH, MSH, LPH. Lille Médical, 17, 1391-1394.
- DUBOIS M.P. (1973) : Recherche par immunofluorescence des cellules adénohypophysaires élaborant les hormones polypeptidiques : ACTH, α -MSH, β -MSH. Bull. Ass. Anat. 57, 63-76.
- DUBOIS M.P. et GRAF L. (1973) : Demonstration by immunofluorescence of the lipotropic hormone/LPH in bovine, ovine and porcine adenohypophysis. Horm. Metab. Res. (abst.) 5, 229 p.
- DUBOIS M.P. et KOLODZIEJCZYK E. (1975) : Centres hypothalamiques du rat, sécrétant la somatostatine : répartition des péricaryons en deux systèmes magno et parvocellulaires (étude immunocytologique). C. R. Acad. Sci. Paris 281, 1737-1740.
- DUBOIS M.P. et RENOUX G. (1971) : Préparation d'anticorps anti-hormones gonadotropes par immunisation intrasplénique. Ann. Inst. Pasteur 121, p. 711.

- DESSY C. et HERLANT M. (1974) : Localisation comparée des immunsérums antilipotropine, anticorticotropine et antimélanotropine β au niveau de l'hypophyse du porc. C. R. Acad. Sci. Paris 278, 1923-1926.
- DESSY C., HERLANT M. et CHRETIEN M. (1973) : Détection par immunofluorescence des cellules synthétisant la lipotropine. C. R. Acad. Sci. Paris 276, 335-338.
- DE WIED D. (1976) : Hormonal influences on motivation, learning and memory processes. Hosp. Practice 11, 123-131.
- DE WIED D. (1977) : Behavioral effects of neuropeptides related to ACTH, MSH and β -LPH. In : ACTH and related peptides : structure, regulation and action. (Eds. KRIEGER D.T. and GANONG W.T.), Ann. N. Y. Acad. Sci. 297, 263-274.
- DIXON H.B.F. (1960) : Chromatographic isolations of pig and human MSH. Biochem. Biophys. Acta 37, 38-42.
- DROUHAULT R., BETHOUS C. et BLANQUET P. (1975) : Etude in vitro de l'activité hypocalcémisante, hypophosphorémisante, hyperlipémisante et immunogène de tronçons peptidiques communs aux hormones ACTH, α et β -MSH et hormone β -lipotropique. C. R. Acad. Sci. Paris 280, 2141-2143.
- DUBOIS M.P. (1971) : Cytologie et immunocytologie de l'hypophyse des bovins (Démonstration technique). In : Fonction gonadotrope et rapports hypothalamo-hypophysaires chez les animaux sauvages. Entretiens de CHIZE, (Ed. M. HERLANT) Masson et Cie, Paris p. 225-235.
- DUBOIS M.P. (1971) : Les cellules corticotropes de l'hypophyse des bovins, ovins et porcins. Mise en évidence par immunofluorescence et caractères cytologiques. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 11, 589-624.
- DUBOIS M.P. (1972 a) : Localisation cytologique par immunofluorescence des sécrétions corticotropes, α et β mélanotropes au niveau de l'antéhypophyse des bovins, ovins et porcins. Z. Zellforsch. 125, 200-209.
- DUBOIS M.P. (1972 b) : Nouvelles données sur la localisation au niveau de l'adénohypophyse des hormones polypeptidiques, ACTH, MSH, LPH. Lille Médical, 17, 1391-1394.
- DUBOIS M.P. (1973) : Recherche par immunofluorescence des cellules adénohypophysaires élaborant les hormones polypeptidiques : ACTH, α -MSH, β -MSH. Bull. Ass. Anat. 57, 63-76.
- DUBOIS M.P. et GRAF L. (1973) : Demonstration by immunofluorescence of the lipotropic hormone/LPH in bovine, ovine and porcine adenohypophysis. Horm. Metab. Res. (abst.) 5, 229 p.
- DUBOIS M.P. et KOLODZIEJCZYK E. (1975) : Centres hypothalamiques du rat, sécrétant la somatostatine : répartition des péricaryons en deux systèmes magno et parvocellulaires (étude immunocytologique). C. R. Acad. Sci. Paris 281, 1737-1740.
- DUBOIS M.P. et RENOUX G. (1971) : Préparation d'anticorps anti-hormones gonadotropes par immunisation intrasplénique. Ann. Inst. Pasteur 121, p. 711.

- DUBOIS P., VARGUES-REGAIRAZ M. et DUBOIS M. P. (1973) : Human foetal antehypophysis : immunofluorescent evidence for corticotropin and melanotropin activities. Z. Zellforsch. 145, 131-143.
- DUKA T., HOLLT V., PRZEWLOCKI R. et WESCHE D. (1978) : Distribution of methionine and leucine-enkephalin within the rat pituitary gland measured by highly specific radioimmunoassays. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1119-1127.
- DUPOUY J.P. et DUBOIS M.P. (1975) : Ontogenesis of the α -MSH, β -MSH and ACTH cells in the foetal hypophysis of the rat. Correlation with the growth of the adrenals and adrenocortical activity. Cell Tiss. Res. 161, 373-384.
- ELDE R., HÖKFELT T., JOHANSSON O. et TERENIUS L. (1976) : Immunohistochemical studies using antibodies to leucine-enkephalin : initial observations on the nervous system of the rat. Neuroscience 1, 349-351.
- ELDE R.P. et PARSONS J.A. (1975) : Immunocytochemical localization of somatostatin in cell bodies of the rat hypothalamus. Amer. J. Anat. 144, 541-548.
- ENJALBERT A., RUBERG M., ARANCIBIA S., PRIAM M. et KORDON C. (1979) : Endogenous opiates block dopamine inhibition of prolactin secretion in vitro. Nature 280, 595-597.
- ESKAY R.L., GIRAUD P., OLIVER C. et BROWNSTEIN M.J. (1979) : Distribution of α -melanocyte-stimulating hormone in the rat brain : evidence that α -MSH containing cells in the arcuate region send projections to extrahypothalamic areas. Brain Res. 178, 55-67.
- ESTIVARIZ F.E. et ITURRIZA F.C. (1975) : "Big" and "small" ACTH in the partes distalis and intermedia of rats and toads. Gen. Comp. Endocrinol. 27, 408-411.
- EVANS H.M., SPARKS L.L. et DIXON J.S. (1966) : The physiology and chemistry of ACTH. In : The pituitary gland vol. 2, pp. 317-369 (Eds. G.W. HARRIS et B.T. DONOVAN), Butterworths, London.
- FISCHER J.L. et MORIARTY C.M. (1977) : Control of bioactive corticotropin release from the neuro-intermediate lobe of the rat pituitary in vitro. Endocrinology 100, 1047-1054.
- FISHMAN J. (1978) : The opiates and the endocrine system. In : The bases of addiction. Ed. J. FISHMAN, pp. 257-280, Dahlem Konferenzen, Berlin.
- FOLLENIUS E. et DUBOIS M.P. (1977) : Localisation immunocytologique de peptides analogues à l' α -endorphine dans certains neurones du noyau latéral du tuber de Carassius auratus L. et Cyprinus carpio L. C. R. Acad. Sci. Paris 285, 1065-1068.
- FOLLENIUS E. et DUBOIS M.P. (1978) : Etude immunocytologique des fibres α -endorphine positives de l'hypothalamus de Carassius auratus L. et Cyprinus carpio L. C. R. Acad. Sci. Paris 286, 1383-1386.
- FREDERICKSON R.C.A. (1977) : Enkephalin pentapeptides. A review of current evidence for a physiological role in vertebrate neurotransmission. Life Sci. 21, 23-42.

FUXE K., ANDERSSON K., HOKFELT T., MUTT V., FERLAND L., AGNATI L.F., GANTEN D., SAID S., ENEROTH P. et GUSTAFSSON J.A. (1979) : Localization and possible function of peptidergic neurons and their interactions with central catecholamine neurons, and the central actions of gut hormones. Fed. Proc. 38, 2333-2340.

FUXE K., HOKFELT T., ENEROTH P., GUSTAFSSON J.A. et SKETT P. (1977) : Prolactin-like immunoreactivity : localization in nerve terminals of rat hypothalamus. Science 196, 899-900.

GILKES J.J.H., BLOOMFIELD G.A., SCOTT A.P., LOWRY P.J., RATCLIFFE J.G., LANDON J. et REES J.H. (1975) : Development and validation of a radioimmunoassay for peptides related to β -melanocyte stimulating hormone in human plasma : the lipotrophins. J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 450-457.

GABE M. (1968) : Techniques histologiques. Masson et Cie. Eds. Paris, 1113 p.

GIROD C. (1964) : Recherches sur la localisation cytotologique de la fonction corticotrope antéhypophysaire. Path. Biol. 12, 1244-1265.

GIROD C. (1976) : Histochemistry of the adenohypophysis. In : Handbuch der Histochemie. Vol. VIII, Part 4, pp. 1-325, Eds. W. GRAUMANN et K. NEUMANN, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

GIROD C. et DUBOIS M.P. (1974 a) : Mise en évidence, par immunofluorescence, des cellules corticotropes et des cellules mélanotropes dans l'adénohypophyse du Hamster doré (*Mesocricetus auratus* Waterh.). C. R. Soc. Biol. 168, 751-754.

GIROD C. et DUBOIS M.P. (1974 b) : Observations sur le lobe intermédiaire et sur le lobe infundibulo-tubéral de l'adénohypophyse chez le singe *Macacus irus* (Cuv.). Bull. Ass. Anat. 58, 557-561.

GOLDSMITH P.C. et GANONG W.F. (1975) : Ultrastructural localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the median eminence of the rat. Brain Res. 97, 181-193.

GOLDSTEIN A., COX B.M., GENTLEMAN S., LOWNY L.I. et CHEUNG A.L. (1977) : Pituitary and brain opioid peptides (endorphins). In : ACTH and related peptides : structure, regulation and action. (Eds : D.T. KRIEGER et W.F. GANONG) pp. 108-114, Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 297.

GOLDSTEIN J.L., ANDERSON R.G.W. et BROWN M.S. (1979) : Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. Nature 279, 679-685.

GOURDJI D., TIXIER-VIDAL A., MORIN A., PRADELLES P., MORGAT J.L., FROMAGEOT P. et KERDELHUE B. (1973) : Binding of a tritiated thyrotropin releasing factor to a prolactin secreting clonal cell line (GH3). Exp. Cell Res. 82, 39-46.

GRAF L. et LI C.H. (1973) : Action of plasmin on ovine beta-lipotropin : revision of the carboxyl terminal sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1304-1309.

GRAF L., SZEKELY J.I., RONAL A.Z., DUNAI-KOVACS Z. et BAJUSZ S. (1976) : Comparative study on analgesic effect of Met⁵-enkephalin and related lipotropin fragments. Nature 263, 240-242.

GRAHAM R.C. et KARNOVSKY M.J. (1966) : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem. 14, 291-303.

- GRAMSCH C., HOLLT V., MEHRAEIN P., PASI A. et HERZ A. (1979) : Regional distribution of methionine-enkephalin and beta-endorphin-like immunoreactivity in human brain and pituitary. Brain Res. 171, 261-270.
- GROS C., PRADELLES P., ROUGET C., BEPOLDIN O., DRAY F., FOURNIE-ZALUSKI M.C., ROQUES B.P., POLLARD H., LLORENS-CORTES C. et SCHWARTZ J.C. (1978) : Radioimmunoassay of methionine and leucine-enkephalins in regions of rat brain and comparison with endorphins estimated by a radioreceptor assay. J. Neurochem. 31, 29-39.
- GUILLEMIN R. (1978) : Biochemical and physiological correlates of hypothalamic peptides : the new endocrinology of the neuron. In : The Hypothalamus (Eds. REICHLIN S., BALDESSARINI R.J. et MARTIN J.B.) Raven Press, New York, pp. 155-194.
- GUILLEMIN R., LING N. et BURGUS R. (1976) : Endorphines, peptides d'origine hypothalamique et neurohypophysaire à activité morphinomimétique. Isolement et structure moléculaire de l' α -endorphine. C. R. Acad. Sci. Paris 282, 783-785.
- GUILLEMIN R., LING N., LAZARUS L., BURGUS R., MINICK S., BLOOM F., NICOLL R., SIGGINS G. et SEGAL D. (1977) : The endorphins, novel peptides of brain and hypothalamic origin, with opiate-like activity : biochemical and biologic studies. In : ACTH and related peptides : structure, regulation and action (Eds. : D.T. KRIEGER et W.F. GANONG) pp. 131-157, The New York Academy of Sciences, New York, vol. 297.
- GUILLEMIN R., SCHALLY A.V., LIPSCOMB H.S., ANDERSEN R.N. et LONG J.M. (1962) : On the presence in hog hypothalamus of β -corticotrophin-releasing factor, α - and β -melanocyte stimulating hormones, adrenocorticotropin, lysine vasopressin and oxytocin. Endocrinology 70, 471-477.
- GUILLEMIN R., VARGO T., ROSSIER J., MINICK S., LING N., RIVIER C., VALE W. et BLOOM F. (1977) : β -endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland. Science 197, 1367-1369.
- HACHMEISTER U. et KRACHT J. (1965) : Antigene Eigenschaften von β -1-24 corticotropin. Virchows Arch. path. Anat. 339, 254-261.
- HAKANSON R., EKMAN R., SUNDLER F. et NILSSON R. (1980) : A novel fragment of the corticotropin- β -lipotropin precursor. Nature 283, 789-792.
- HAKANSON R., LARSSON L.I., NOBIN A. et SUNDLER F. (1972) : Tryptamine or tryptophyl peptides in endocrine cells of the mammalian adenohypophysis ? J. Histochem. Cytochem. 20, 908-916.
- HERBERT D.C. (1975) : Localization of antisera to LH β and FSH β in the rat pituitary gland. Am. J. Anat. 144, 379-385.
- HERBERT D.C. (1976) : Immunocytochemical evidence that LH and FSH are present in the same cell type in the rhesus monkey pituitary gland. Endocrinology 98, 1554-1557.
- HESS R., BARRATT D. et GELZER J. (1968) : Immunofluorescent localization of β -corticotropin in the rat pituitary. Experientia (Bâle) 24, 584-585.

- HOKFELT T., ELDE R., FUXE F., JOHANSSON O., LJUNGDAHL A., GOLDSTEIN M., LUFT R., EFENDIC S., NILSSON G., TERENIUS L., GANTEN D., JEFFCOATE S.L., REHFELD J., SAID S., PEREZ DE LA MORA M., POSSANI L., TAPIA R., TERAN L. et PALACIOS R. (1978) : Aminergic and peptidergic pathways in the nervous system with special reference to the hypothalamus. In : The Hypothalamus (Eds : S. REICHLIN et R. BALDESSARINI) Raven Press, New York, pp. 69-135.
- HOKFELT T., ELDE R., JOHANSSON O., TERENIUS L. et STEIN L. (1977) : The distribution of enkephalin-immunoreactive cell bodies in the rat central nervous system. Neurosci. Lett. 5, 25-31.
- HOPKINS C.R. et GREGORY H. (1977) : Topographical localization of the receptors for luteinizing hormone-releasing hormone on the surface of dissociated pituitary cells. J. Cell. Biol. 75, 528-540.
- HONG J.S., YANG H.Y.T., FRATTA W. et COSTA E. (1977) : Determination of methionine enkephalin in discrete regions of rat brain. Brain Res. 134, 383-386.
- HOSOBUCHI Y., ROSSIER J., BLOOM F.E. et GUILLEMIN R. (1979) : Stimulation of human periaqueductal gray for pain relief increases immunoreactive β -endorphin in ventricular fluid. Science, 203, 279-281.
- HOWE A. et MAXWELL D.S. (1968) : Electron microscopy of the pars intermedia of the pituitary gland in the rat. Gen. Comp. Endocrinol. 11, 169-185.
- HOWE A. et THODY A.J. (1970) : The "*in vitro*" assay of pituitary MSH. J. Physiol. (Lond.) 209, 5-7.
- HUGHES J. (1975) : Isolation of an endogenous compound from the brain with the pharmacological properties similar to morphine. Brain Res. 88, 295-308.
- HUGHES J., KOSTERLITZ H.W. et SMITH T.W. (1977) : The distribution of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in the brain and peripheral tissues. Brit. J. Pharmacol. 61, 639-647.
- HUGHES J., SMITH T.W., KOSTERLITZ H.W., FOTHERGILL L.A., MORGAN B.A. et MORRIS H.R. (1975) : Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature 258, 577-579.
- JACOBOWITZ D.M. et O'DONOHUE T.L. (1978) : α -melanocyte stimulating hormone : immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 75, 6300-6304.
- JARETT L., LACY P.E. et KIPNIS D.M. (1964) : Characterization by immunofluorescence of an ACTH-like substance in non pituitary tumors from patients with hyperadrenocorticism. J. Clin. Endocrinol. 24, 542-549.
- JENKS B.G., MEULEPAS W.J.A.M., SOONS P.J.A. et VAN OVERBEEKE A.P. (1979) : Biosynthesis of MSH and related peptides in the pars intermedia of the mouse : a pulse-chase analysis. Mol. Cell. Endocrinol. 13, 149-158.
- JENNES L. et CROIX D. (1980) : Changes in the LHRH-immunoreactivity of hypothalamic structures during late pregnancy and after parturition in the guinea pig. Cell Tissue Res. 205, 121-131.

- JOSEFSBERG Z., POSNER B.I., PATEL B. et BERGERON J.J.M. (1979) : Intracellular polypeptide hormone receptors : the uptake of intact prolactin into Golgi apparatus of female rat liver. J. Biol. Chem. 254, 209-214.
- KANGAWA K., MATSUO H. et IGARASHI M. (1979) : α -neo-endorphin : a "big" leu-enkephalin with potent opiate activity from porcine hypothalami. Biochem. Biophys. Res. Commun. 86, 153-160.
- KASTIN A.J., BEACH G.D., HAWLEY W.D., KENDALL J.W. Jr, EDWARDS M.S. et SCHALLY A.V. (1973) : Dissociation of MSH and ACTH release in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 770-774.
- KOBAYASHI R.M., PALKOVITS M., MILLER R.J., CHANG K.J. et CUATRECASAS P. (1978) : Brain enkephalin distribution in unaltered by hypophysectomy. Life Sci. 22, 527-530.
- KRACHT J., HACHMEISTER U., BREUSTEDT H.J. et FISCHER K. (1965) : Immunohistological studies on the pituitary ACTH-production sites using anti β (1-24) corticotropin. Acta Endocrinol. (Kbh.) Suppl. 100, p. 36.
- KRACHT J., ZIMMERMANN H. et HACHMEISTER U. (1966) : Immunohistologischer ACTH-Nachweis in einem R-Zellenadenom des Hypophysenvorderlappens beim Morb. Cushing. Virchows Arch. path. Anat. 340, 270-275.
- KRAICER J. (1977) : Control of ACTH and MSH release from the pars intermedia : *in vitro* studies. In : Frontiers of Hormone Research, vol. 4, pp. 200-207 (Ed. Van Wimersma Greidanus) S. Karger Basel.
- KRAICER J., BENCOSME S.A. et GOSBEE J.L. (1971) : The pars intermedia and ACTH secretion in the rat. Fed. Proc. 30, p. 533.
- KRAICER J. et DHARIWAL A.P.S. (1974) : Libération de l'ACTH *in vitro* à partir de cellules dispersées du lobe intermédiaire. C.R. Acad. Sci. (Paris) 278, 935-938.
- KRAICER J., GOSBEE J.L. et BENCOSME S.A. (1973) : Pars intermedia and pars distalis: two sites of ACTH production in the rat hypophysis. Neuroendocrinology 11, 156-176.
- KRAICER J. et MORRIS A.R. (1976 a) : *In vitro* release of ACTH from dispersed rat pars intermedia cells. I. Effect of secretagogues. Neuroendocrinology 20, 79-96.
- KRAICER J. et MORRIS A.R. (1976 b) : *In vitro* release of ACTH from dispersed rat pars intermedia cells. II. Effect of neurotransmitter substances. Neuroendocrinology 21, 175-192.
- KRIEGER D.T., LIOTTA A. et BROWNSTEIN M.J. (1977 a) : Presence of adrenocorticotropin in brain of normal and hypophysectomized rat. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 648-652.
- KRIEGER D.T., LIOTTA A. et BROWNSTEIN M.J. (1977 b) : Presence of corticotropin in limbic system of normal and hypophysectomized rat. Brain Res. 128, 575-579.
- KRIEGER D.T., LIOTTA A. et LI C.H. (1977 c) : Human plasma immunoreactive β -lipotropin : correlation with basal and stimulated plasma ACTH concentrations. Life Sci. 21, 1771-1778.
- KRIEGER D.T., LIOTTA A., SUDA T., PALKOVITS M. et BROWNSTEIN M.J. (1977 d) : Presence of immunoassayable β -lipotropin in bovine brain and spinal cord : lack of concordance with ACTH concentrations. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 930-936.

- KRIEGER M.S., CONRAD L.C.A. et PFAFF D.W. (1977) : Axonal projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. Anat. Rec. 187, 770-771.
- KRISCH B. (1978) : Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of somatostatin-immunoreactive elements, in the rat brain. Cell Tissue Res. 195, 499-513.
- KUMAR M.S.A., CHEN C.L. et MUTHER T.F. (1979) : Changes in the pituitary and hypothalamic content of methionine-enkephalin during the estrous cycle of rats. Life Sci. 25, 1687-1696.
- LARSSON L.I. (1977) : Corticotropin-like peptides in central nerves and in endocrine cells of gut and pancreas. Lancet II, 1321-1323.
- LARSSON L.I. (1978) : Distribution of ACTH-like immunoreactivity in rat brain and gastro-intestinal tract. Histochemistry 55, 225-233.
- LEBOVITZ H.E. et ENGEL F.L. (1965) : *In vivo* and *in vitro* adipokinetic effects of corticotropin and related peptides. In : Handbook of Physiology, Sect. 5; p. 541-547, Eds. A.E. RENOLD et G.F. CASHILL Jr., Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- LEE T.H., LERNER A.B. et BUETTNER-JANUSCH V. (1961) : The isolation and structure of α and β -MSH from monkey pituitary glands. J. Biol. Chem. 236, 1390-1394.
- LEGAIT E. (1963) : Cytophysiologie du lobe intermédiaire de l'hypophyse des Mammifères. In : Cytologie de l'adénohypophyse (Eds J. BENOIT et C. DA LAGE) pp. 215-230. Editions du CNRS, Paris.
- LEGAIT E., BURLET C., LEGAIT H., BURLET A., DUSSART G. et MARCHETTI J. (1970) : Quelques modifications endocriniennes au cours de l'hibernation et du cycle annuel chez le Lérot (*Eliomys quercinus* L.). Bull. Ass. Anat. 145 bis, 1-52.
- LEONARDELLI J., BARRY J. et DUBOIS M.P. (1973) : Mise en évidence par immunofluorescence d'un constituant immunologiquement apparenté au LH-RF dans l'hypothalamus et l'éminence médiane des Mammifères. C.R. Acad. Sci. Paris, 276, 2043-2046.
- LEONARDELLI J. et TRAMU G. (1979) : Immunoreactivity for β -endorphin in LH-RH neurons of the fetal human hypothalamus. Cell Tissue Res. 203, 201-207.
- LI C.H. (1964) : Lipotropin : a new active peptide from pituitary glands. Nature 201, 924-925.
- LI C.H., BARNAFI M., CHRETIEN M. et CHUNG D. (1965) : Isolation and amino-acid sequence of β -LPH from sheep pituitary gland. Nature 208, 1093-1094.
- LI C.H. et CHUNG D. (1976) : Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A 73, 1145-1148.
- LI C.H., LEMAIRE S., YAMASHIRO D. et DONEEN B.A. (1976) : The synthesis and opiate activity of β -endorphin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 19-25.
- LIEN E.L., CLARK D.E. et MCGREGOR W.H. (1978) : Stimulation of growth hormone and prolactin release by a potent enkephalin analog. FEBS Lett. 88, 208-210.

- LIEN E.L., FENICHEL R.L., GARSKY V., SARANTAKIS D. et GRANT N.H. (1976) : Enkephalin stimulating prolactin release. Life Sci. 19, 837-840.
- LINDBERG I., SMYTHE S.J. et DAHL J.L. (1979) : Regional distribution of enkephalin in bovine brain. Brain Res. 168, 200-204.
- LING N., BURGUS R. et GUILLEMIN R. (1976) : Isolation, primary structure and synthesis of α -endorphin and γ -endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3942-3946.
- LING N. et GUILLEMIN R. (1976) : Morphinomimetic activity of synthetic fragments of beta-lipotropin and analogs. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3308-3310.
- LIOTTA A.S., GILDERSLEEVE D., BROWNSTEIN M.J. et KRIEGER D.T. (1979) : Biosynthesis *in vitro* of immunoreactive 31000 dalton corticotropin/ β -endorphin-like material by bovine hypothalamus. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1448-1452.
- LOH Y.P. et GAINER H. (1977) : Heterogeneity of melanotropic peptides in the pars intermedia and brain. Brain Res. 130, 169-175.
- MAINS R.E. et EIPPER B.A. (1979) : Synthesis and secretion of corticotropins, melanotropins and endorphins by rat intermediate pituitary cells. J. Biol. Chem. 254, 7885-7894.
- MAINS R.E., EIPPER B.A. et LING N. (1977) : Common precursor to corticotropins and endorphins. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3014-3017.
- MARSHALL J.M. (1951) : Localization of ACTH by histochemical and immunochemical methods. J. Exp. Med. 94, 21-30.
- MARTIN J.B. (1976) : Brain regulation of growth hormone secretion. In : Frontiers in Neuroendocrinology, eds L. MARTINI et W.F. GANONG. Raven Press, New York, vol. 4, p. 129-168.
- MARTIN R., WEBER E. et VOIGT K.H. (1979) : Localization of corticotropin- and endorphin-related peptides in the intermediate lobe of the rat pituitary. Cell Tiss. Res. 196, 307-319.
- MAY P.B., MITTLER J.C. et ERTEL N.H. (1979 a) : Enkephalins and pituitary hormone release. Modification of responsiveness to LH-RH. Hormone Res. 10, 57-63.
- MAY P., MITTLER J., MANOUGIAN A. et ERTEL N. (1979 b) : TSH release-inhibiting activity of leucine-enkephalin. Horm. Metab. Res. 11, 30-33.
- MAYOR H.D., HAMPTON J.C. et ROSARIO B. (1961) : A simple method for removing the resin from epoxy-embedded tissue. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 909-910.
- MAZZUCA M. (1975) : Individualisation morphofonctionnelle des terminaisons nerveuses périvasculaires de l'éminence médiane (chez les Mammifères) en microscopie électronique. Réunion de la D.G.R.S.T. Biologie de la Reproduction et du Développement (Paris).
- MEGLIO M., HOSOBUCHI Y., LOH H.H., ADAMS J.E. et LI C.H. (1977) : β -endorphin : behavioral and analgesic activity in cats. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 774-776.

- MEITES J. (1974) : Control of prolactin secretion in animals. In : Human prolactin (Eds PASTEELS J.L. et ROBYN C.) Excerpta Medica Amsterdam Int. Congr. Ser. 308, 105-118.
- MEITES J., BRUNI J.F., VAN VUGT D.A. et SMITH A.F. (1979) : Relation of endogenous opioid peptides and morphine to neuroendocrine functions. Life Sci. 24, 1325-1336.
- MEZEY E., KIKOVICS P. et PALKOVITS M. (1979) : Pituitary-brain retrograde transport. Trends Neurosci., 2, 57-60.
- MEZEY E., PALKOVITS M., DEKLOET E.R., VERHOEF J. et DE WIED D. (1978) : Evidence for pituitary-brain transport of a behaviorally potent ACTH analog. Life Sci. 22, 831-838.
- MIALHE-VOLOSS C. (1958) : Posthypophyse et activité corticotrope. Acta Endocrinol. (Kbh) Suppl. 35, 1-96.
- MILLER R.J., CHANG K.J., COOPER B. et CUATRECASAS D. (1978) : Radioimmunoassay and characterization of enkephalins in rat tissue. J. Biol. Chem. 253, 531-538.
- MITTLER J.C., MAY P.B. et ERTEL N.H. (1978) : Synergism between prolactin releasing actions of thyrotropin releasing hormone (TRH) and of leucine enkephalin (LE). IRCS Med. Sci. 6, 326 p.
- MOELLMANN G.E., VARGA J.M., GODAWSKA E.W., LAMBERT D.T. et LERNER A.B. (1978) : Compartmentalized action of melanotropin (MSH) : the role of endocytosis in the hormonal activation of tyrosinase in murine melanoma cells. J. Cell. Biol. 79, 196a.
- MOLDOW R. et YALOW R.S. (1978) : Extrahypophysial distribution of corticotropin as a function of brain size. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 994-998.
- MOON H.D., LI C.H. et JENNINGS B.M. (1973) : Immunohistochemical and histochemical studies of pituitary β -lipotrophs. Anat. Rec. 175, 529-537.
- MORIARTY G.C. (1973) : Adenohypophysis : ultrastructural cytochemistry. A review. J. Histochem. Cytochem. 21, 855-894.
- MORIARTY G.C. (1977) : Heterogeneity of ACTH-containing cells in the rat pituitary with emphasis on the structure and function of the intermediate lobe. In : ACTH and related peptides : structure, regulation and action (Eds : D.T. KRIEGER et W.F. GANONG) pp. 183-200, Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 297.
- MORIARTY G.C. et HALMI N.S. (1972 a) : Adrenocorticotropin production by the intermediate lobe of the rat pituitary. An electron microscopic-immunohistochemical study. Z. Zellforsch. 132, 1-14.
- MORIARTY G.C. et HALMI N.S. (1972 b) : Electron microscopic study of the adrenocorticotropin producing cell with the use of unlabeled antibody and the soluble peroxidase-antiperoxidase complex. J. Histochem. Cytochem. 20, 590-603.
- MORIARTY G.C., HALMI N.S. et MORIARTY C.M. (1975) : The effect of stress on the cytology and immunocytochemistry of pars intermedia cells in the rat pituitary. Endocrinology, 96, 1426-1436.

- MORIARTY C.M. et MORIARTY G.C. (1975) : Bioactive and immunoactive ACTH in the rat pituitary : influence of stress and adrenalectomy. Endocrinology, 96, 1419-1425.
- NAIK D.V. (1973) : Electron microscopic immunocytochemical localization of adrenocorticotropin and MSH in the pars intermedia cells of rats and mice. Z. Zellforsch. 142, 305-328.
- NAKANE P.K. (1968) : Simultaneous localization of multiple tissue antigens utilizing the peroxidase-labeled antibody method : a study on pituitary glands of the rat. J. Histochem. Cytochem. 16, 557-560.
- NAKANE P.K. (1970) : Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. J. Histochem. Cytochem. 18, 9-21.
- NAKANISHI S., INOUE A., KITA T., NAKAMURA M., CHANG A.C.Y., COHEN S.N. et NUMA S. (1979) : Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. Nature 278, 423-427.
- NIEUWENHUIJZEN-KRUSEMAN A.C. et SCHRODER-VAN DER ELST J.P. (1976) : The immunolocalization of ACTH and α -MSH in human and rat pituitaries. Virchows Arch. B Cell Path. 22, 263-272.
- NILAVER G., ZIMMERMAN E.A., DEFENDINI R., LIOTTA A.S., KRIEGER D.T. et BROWNSTEIN M.J. (1979) : Adrenocorticotropin and β -lipotropin in the hypothalamus. Localization in the same arcuate neurons by sequential immunocytochemical procedures. J. Cell Biol. 81, 50-58.
- NORTH R.A. (1979) : Opiates, opioid peptides and single neurones. Life Sci. 24, 1527-1546.
- NOZAKI M., TAKETANI Y., MINAGUCHI H., TOMONORI K. et KOBAYASHI H. (1979) : Distribution of LHRH in the rat and mouse brain with special reference to the tanycytes. Cell Tissue Res. 197, 195-212.
- O'DONOHUE T.L., MILLER R.L. et JACOBOWITZ D.M. (1979) : Identification, characterization of intraneuronal α -melanocyte stimulating hormone-like immunoreactive peptides in discrete regions of the rat brain. Brain Res. 176, 101-123.
- OGAWA N., PANERAI A.E., LEE S., FORSBACH G., HAVLICEK V. et FRIESEN H.G. (1979) : β -endorphin concentration in the brain of intact and hypophysectomized rats. Life Sci. 25, 317-326.
- OLIVER C., MICAL R.S. et PORTER J.C. (1977) : Hypothalamic pituitary vasculature. Evidence of retrograde blood flow in the pituitary stalk. Endocrinology 101, 598-604.
- OLIVER C. et PORTER J.C. (1978) : Distribution and characterization of α -melanocyte stimulating hormone in the rat brain. Endocrinology 102, 697-708.
- ORTH D.N. et NICHOLSON W.E. (1977) : High molecular weight forms of human ACTH are glycoproteins. J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 214-217.
- OSBORNE H., HOLLT V. et HERZ A. (1978) : Subcellular distribution of enkephalins and endogenous opioid activity in rat brain. Life Sci. 22, 611-618.

- PASTERNAK G.W., GOODMAN R. et SNYDER S.H. (1975) : An endogenous morphine-like factor in mammalian brain. Life Sci. 16, 1765-1769.
- PEARSE A.G.E. et VAN NOORDEN S. (1963) : The functional cytology of the human adenohypophysis. Canad. Med. Ass. J. 88, 462-471.
- PELLETIER G., ARIMURA A., LABRIE F. et SCHALLY A.V. (1974) : Electron microscopic immunohistochemical localization of growth hormone release inhibiting hormone (somatostatin) in the rat median eminence. Amer. J. Anat. 140, 445-450.
- PELLETIER G. et DUBE D. (1977) : Electron microscopic immunohistochemical localization of α -MSH in the rat brain. Amer. J. Anat. 150, 201-205.
- PELLETIER G. et LECLERC R. (1979) : Immunohistochemical localization of adrenocorticotropin in the rat brain. Endocrinology 104, 1426-1432.
- PELLETIER G., LECLERC R., LABRIE F., COTE J., CHRETIEN M. et LIS M. (1977) : Immunohistochemical localization of β -lipotropic hormone in the pituitary gland. Endocrinology 100, 770-776.
- PERRET M., DUBOIS M.P. et PETTER-ROUSSEAU A. (1971) : Les cellules corticotropes dans l'hypophyse d'un Lémurien malgache. : *Microcebus murinus*. Identification par immunofluorescence. C.R. Acad. Sci. (Paris) 272, 2804-2807.
- PERT C.B., KUCHAR M.J. et SNYDER S.H. (1975) : Autoradiographic localization of the opiate receptor in rat brain. Life Sci. 16, 1849-1854.
- PERT C.B. et SNYDER S.H. (1973) : Opiate receptor : demonstration in nervous tissue. Science 179, 1011-1014.
- PETRALI J.P., HINTON D.M., MORIARTY G.C. et STERNBERGER L.A. (1974) : The unlabeled antibody enzyme method of immunocytochemistry. Quantitative comparison of sensitivities with and without peroxidase anti-peroxidase complex. J. Histochem. Cytochem. 22, 782-801.
- PHIFER R.F., ORTH D.N. et SPICER S.S. (1974) : Specific demonstration of the human hypophyseal adrenocorticotropin (ACTH/MSH) cell. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 684-692.
- PHIFER R.F. et SPICER S.S. (1970) : Immunologic and immunopathologic demonstration of adrenocorticotropin hormone in the pars intermedia of the adenohypophysis. Lab. Invest. 23, 543-550.
- PHIFER R.F., SPICER S.S. et ORTH D.N. (1970) : Specific demonstration of the human hypophyseal cells which produce adrenocorticotropin hormone. J. Clin. Endocr. 31, 347-361.
- PICKEL V.M., JOH T.H., REIS D.J., LEEMAN S.E. et MILLER R.J. (1979). Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons. Brain Res. 160, 387-400.
- PILGRIM C. (1978) : Transport function of hypothalamic tanycyte ependyma : how good is the evidence ? Neuroscience 3, 277-283.
- POLLARD H., LLORENS-CORTES C. et SCHWARTZ J.C. (1977) : Enkephalin receptors on dopaminergic neurones in rat striatum. Nature 268, 745-747.

- POLLARD H., LLORENS C., SCHWARTZ J.C., GROS C. et DRAY F. (1978) : Localization of opiate receptors and enkephalins in the rat striatum in relationship with the nigrostriatal dopaminergic system : lesion studies. Brain Res. 151, 392-398.
- POMERANTZ S.H. et CHUANG L. (1970) : Effects of β -MSH, cortisol and ACTH on tyrosinase in the skin of new born hamster and mice. Endocrinology, 87, 302-310.
- PORTE A., KLEIN M.J., STOECKEL M.E. et STUTINSKY F. (1971) : Sur l'existence de cellule de type "corticotrope" dans la pars intermedia de l'hypophyse du rat. Etude au microscope électronique. Z. Zellforsch. 115, 60-68.
- ✓ POULAIN P. (1974) : L'hypothalamus et le septum de cobaye de 400 grammes en coordonnées stéréotaxiques. Arch. Anat. Micr. 63, 37-50.
- POULAIN P. (1977) : Septal afferents to the arcuate-median eminence region in the guinea-pig : correlative electrophysiological and horseradish peroxidase studies. Brain Res. 137, 150-153.
- ✓ POULAIN P. (1979) : Etude descriptive et fonctionnelle de l'aire septopréoptique et de ses relations avec la région infundibulaire chez le Cobaye. Thèse Science, Université de Lille, n° 447, pp. 1-140.
- POULAIN P. et PARTOUCHE C. (1973) : Relations des neurones de la région préoptique et du septum avec le noyau arqué et l'éminence médiane. C. R. Acad. Sci. Paris, 277, 737-739.
- PURVES H.D. (1961) : Morphology of the hypophysis related to its function. In : Sex and internal secretions (Eds W.C. YOUNG et G.W. CORNER). Vol. I, pp. 161-239. Wilkins and Williams Co., Baltimore.
- RANGEL H. (1968) : Studies on passive haemolysis mediated by antiserum globulin antibodies. Immunology 14, 197-213.
- RANGEL H. et REPKA D. (1965) : The use of passive haemolysis in the quantitative estimation of anti-protein antibodies. Immunology 8, 618-627.
- RICCI V. et RUSSOLO M. (1968) : Osservazioni immunocitologiche sulla localizzazione dell'ACTH nella ipofisi di cane. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 44, 1624-1626.
- RICHARDSON K.C., JARETT L. et FINKE E.H. (1960) : Note of the use of araldite epoxy-resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. Stain Technol. 35, 313-323.
- RIVIER C., VALE W., LING N., BROWN M. et GUILLEMIN R. (1977) : Stimulation *in vivo* of the secretion of prolactin and growth hormone by β -endorphin. Endocrinology, 100, 238-241.
- ROBERTS J.L. et HERBERT E. (1977 a) : Characterization of a common precursor to corticotropin and β -lipotropin : cell-free synthesis of the precursor and identification of corticotropin peptides in the molecule. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4826-4830.
- ROBERTS J.L. et HERBERT E. (1977 b) : Characterization of a common precursor to corticotropin and β -lipotropin : identification of β -lipotropin peptides and their arrangement relative to corticotropin in the precursor synthesized in a cell-free system. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5300-5304.

- ROBERTS J.L., PHILLIPS M., ROSA P.A. et HERBERT E. (1978) : Steps involved in the processing of common precursor forms of adrenocorticotropin and endorphin in cultures of mouse pituitary cells. Biochemistry 17, 3609-3618.
- ROCHEFORT G.J., ROSENBERGER J. et SAFFRAN M. (1959) : Depletion of pituitary corticotrophin by various stresses and by neurohypophysial preparations. J. Physiol. (London) 146, 105-116.
- ROMEIS B. (1940) : Hypophyse. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Vol. VI/3 (ed. W. MOLLENDORFF), Springer Verlag, Berlin.
- ROSSIER J., VARGO T.M., MINICK S., LING N., BLOOM F.E. et GUILLEMIN R. (1977) : Regional dissociation of β -endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5162-5165.
- ROSSIER J., BATTENBERG E., PITTMAN Q., BAYON A., KODA L., MILLER R., GUILLEMIN R. et BLOOM F. (1979) : Hypothalamic enkephalin neurones may regulate the neurohypophysis. Nature 277, 653-655.
- ROTSZTEJN W.H., DROUVA S.V., PATTOU E. et KORDON C. (1978) : Met-enkephalin inhibits *in vitro* dopamine-induced LHRH release from mediobasal hypothalamus of male rats. Nature 274, 281-282.
- RUBINSTEIN M., STEIN S. et UDEFRIEND S. (1978) : Characterization of pro-opioid cortin, a precursor to opioid peptides and corticotropin. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 669-671.
- RUSSOLO M. et BET E. (1969) : Localizzazione di anticorpi anti $\beta(1-24)$ corticotropina, *in vivo*, in cellule ipofisarie. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 45, 924-925.
- SAFFRAN M. et SCHALLY A.V. (1977) : The status of the corticotropin releasing factor (CRF). Neuroendocrinology 24, 359-375.
- SAR M., STUMPF W.E., MILLER R.J., CHANG K.J. et CUATRECASAS P. (1978) : Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. J. Comp. Neurol. 182, 17-38.
- SCHALLY A.V., LIPSCOMB H.S., LONG J.M., DEAR D.W. et GUILLEMIN R. (1962) : Chromatography and hormonal activities of dog hypothalamus. Endocrinology 70, 478-480.
- SCHICK A.F. et SINGER S.J. (1961) : On the formation of covalent linkages between two protein molecules. J. Biol. Chem. 236, 2477-2485.
- SCOTT A.P., BENNETT H.P.J., LOWRY P.J., McMARTIN C. et RATCLIFFE J.G. (1972) : Corticotrophin-like intermediate-lobe peptide, a new pituitary and tumour peptide. J. Endocrinol. 55, 36-37.
- SCOTT A.P., BENNETT H.P.J., LOWRY P.J., McMARTIN C. et RATCLIFFE J.G. (1973) : Characterisation of corticotropin-like intermediate lobe peptides from rat and pig pituitaries and identification of α -melanocyte-stimulating hormone in the rat pituitary. J. Endocrinol. 58, 15 P.
- SCOTT A.P. et LOWRY P.J. (1974) : Adrenocorticotrophic and melanocyte-stimulating peptides in the human pituitary. Biochem. J. 139, 593-602.

- SCOTT A.P., LOWRY P.J., BENNETT H.P.J., McMARTIN C. et RATCLIFFE J.G. (1974 a) : Purification and characterization of porcine corticotrophin-like intermediate lobe peptide. J. Endocrinol. 61, 369-380.
- SCOTT A.P., LOWRY P.J., RATCLIFFE J.G., REES L.H. et LANDON J. (1974 b) : Corticotropin like peptides in the rat pituitary. J. Endocrinol. 61, 355-367.
- SCOTT A.P., LOWRY P.J. et VAN WIMERSMA GREIDANUS T.B. (1976) : Incorporation of ¹⁴C-labelled amino acids into corticotrophin-like intermediate lobe peptide and α -melanocyte-stimulating hormone by the rat pituitary neurointermediate lobe *in vitro*, and the identification of four new pars intermedia peptides. J. Endocrinol. 70, 197-205.
- SCOTT D.E. et PAULL W.K. (1979) : The tanycyte of the rat median eminence. I. Synaptoid contacts. Cell Tissue Res. 200, 329-334.
- SHAAR C.J., FREDERICKSON R.C.A., DININGER N.B. et JACKSON L. (1977) : Enkephalin analogues and naloxone modulate the release of growth hormone and prolactin. Evidence for regulation by an endogenous opioid peptide in brain. Life Sci. 21, 853-860.
- SHIINO M. (1967) : Immunocytological observations on cellular localization of ACTH in the rat anterior pituitary gland. Anat. Rec. 157, p. 389.
- SILVERMAN A.J. et ZIMMERMAN E.A. (1975) : Ultrastructural immunocytochemical localization of neurophysin and vasopressin in the median eminence and posterior pituitary of the guinea-pig. Cell Tissue Res. 159, 291-301.
- SIMANTOV R., KUHAR M.J., PASTERNAK G.W. et SNYDER S.H. (1976 a) : The regional distribution of a morphine-like factor enkephalin in monkey brain. Brain Res. 106, 189-197.
- SIMANTOV R., KUHAR M.J., UHL G.R., et SNYDER S.H. (1977) : Opioid peptide enkephalin : immunohistochemical mapping in rat central nervous system. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2167-2171.
- SIMANTOV R., SNOWMAN A.M. et SNYDER S.H. (1976 b) : A morphine-like factor enkephalin in rat brain subcellular localization. Brain Res. 107, 650-657.
- SIMANTOV R. et SNYDER S.H. (1976) : Brain pituitary opiate mechanisms : pituitary opiate receptor binding radioimmunoassays for methionine enkephalin and leucine enkephalin, and ³H-enkephalin interactions with the opiate-receptor. In : Opiates and endogenous peptides, ed. H.W. KOSTERLITZ, pp. 41-48, Elsevier North-Holland, Amsterdam.
- SIMON E.J., HILLER J.M. et EDELMAN I. (1973) : Stereospecific binding of the potent analgesic (³H) etorphine to rat-brain homogenate. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1947-1949.
- SIPERSTEIN E.R. (1963) : Identification of the adrenocorticotrophin-producing cells in the rat hypophysis by autoradiography. J. Cell. Biol. 17, 521-546.
- SIPERSTEIN E.R. et ALLISON V.F. (1965) : Fine structure of the cells responsible for the secretion of adrenocorticotrophin in the adrenalectomized rat. Endocrinology, 76, 70-79.

SKOWSKY W.R. et FISCHER D.A. (1972) : The use of thyroglobulin to induce antigenicity to small molecules. J. Lab. Clin. Med. 80, 134-144.

SOFRONIEW M.V. (1979) : Immunoreactive β -endorphin and ACTH in the same neurons of the hypothalamic arcuate nucleus in the rat. Amer. J. Anat. 154, 283-289.

STEFAN Y. et DUBOIS M.P. (1972) : Localisation par immunofluorescence des hormones corticotropes et mélanotropes dans l'hypophyse du rongeur *Ellobius lutescens* (Th.). Z. Zellforsch. 133, 353-365.

STEFANINI M., DE MARTINO C. et ZAMBONI L. (1967) : Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. Nature 216, 173 p.

STERNBERGER L.A., HARDY P.H., CUCULIS J.J. et MEYER H.G. (1970) : The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J. Histochem. Cytochem. 18, 315-333.

STERNBERGER L.A. et PETRALI J.P. (1975) : Quantitative immunocytochemistry of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone. Cell Tissue Res. 162, 141-176.

STERNBERGER L.A., PETRALI J.P., JOSEPH S.A., MEYER H.G. et MILLS K.R. (1978) : Specificity of the immunocytochemical luteinizing hormone-releasing hormone receptor reaction. Endocrinology 102, 63-73.

STOECKEL M.E., DELLMANN H.D., PORTE A. et GERTNER C. (1971) : The rostral zone of the intermediate lobe of the mouse hypophysis, a zone of particular concentration of corticotrophic cells. A light and electron study. Z. Zellforsch. 122 310-322.

SWAAB D.F. et FISSER B. (1977) : Immunocytochemical localization of α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-like compound in the rat nervous system. Neurosci. Lett. 7, 313-317.

SWAAB D.F. et VISSER M. (1977) : A function for α -MSH in fetal development and the presence of an α -MSH-like compound in nervous tissue. In : Frontiers of hormone research vol. 4, pp. 170-178 (Ed. T.B. VAN WIMERSMA GREIDANUS), S. Karger Basel.

TALEISNIK S., TOMATIS M.E. et CELIS M.E. (1972) : Role of catecholamines in the control of melanocyte-stimulating hormone secretion in rats. Neuroendocrinology 10, 235-245.

TERENIUS L. (1973) : Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. Acta Pharmacol. Toxicol. 32, 317-320.

TESCHEMACHER H., OPHEIM K.E., COX B.M. et GOLDSTEIN A. (1975) : A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine I. Isolation. Life Sci. 16, 1771-1776.

THODY A.J. et SHUSTER S. (1973) : MSH may control sebum secretion in mammals. Nature 245, 207-209.

- TIXIER-VIDAL A., TOUGARD C. et PICARD R. (1976) : Subcellular localization of some protein and glycoprotein hormones of the hypothalamo-hypophyseal axis as revealed by the peroxidase labeled antibody method. In : First international Symposium on immunoenzymatic techniques, pp. 307-321, Eds. G. FELDMANN et coll., Symposium n° 2, INSERM, Paris.
- TOUBEAU G. (1978) : Identification immunocytochimique de neurones contenant de l'ACTH 17-39 dans le cerveau du rat. C. R. Acad. Sci. Paris 287, 499-502.
- TOUBEAU G., DESCLIN J., PARMENTIER M. et PASTEELS J.L. (1979 a) : Cellular localization of a prolactin-like antigen in the rat brain. J. Endocrinol. 83, 261-266.
- TOUBEAU G., DESCLIN J., PARMENTIER M. et PASTEELS J.L. (1979 b) : Compared localization of prolactin-like and adrenocorticotropin immunoreactivities within the brain of the rat. Neuroendocrinology 29, 374-384.
- TOUGARD C., KERDELHUE B., TIXIER-VIDAL A. et JUTISZ M. (1971) : Localisation par cytoimmunoenzymologie de la LH, de ses sous-unités α et β , et de la FSH dans l'adénohypophyse de la ratte castrée. C. R. Acad. Sci. (Paris) 273, 897-900.
- TOUGART C., KERDELHUE B., TIXIER-VIDAL A. et JUTISZ M. (1973) : Light and electron microscope localization of binding sites of antibodies against ovine luteinizing hormone and its two subunits in rat adenohipophysys using peroxidase-labeled antibody technique. J. Cell Biol. 58, 503-521.
- TRAMU G. (1969) : Les cellules thyroïotropes de l'antéhypophyse du cobaye mâle au cours de diverses circonstances expérimentales et physiologiques. C.R. Soc. Biol. 163, 1560-1562.
- TRAMU G. et BEAUVILLAIN J.C. (1979) : Pituitary polypeptide secreting cell : immunocytochemical identification of ACTH, MSH and peptides related to LPH. In : Synthesis and release of adenohipophyséal hormones : cellular and molecular mechanism. Eds. K.W. MCKERNS et M. JUTISZ. Plenum Press, New York, pp. 39-66.
- TRAMU G., BEAUVILLAIN J.C., CROIX D. et LEONARDELLI J. (1980) : Comparative immunocytochemical localization of enkephalin and somatostatin in the median eminence, hypothalamus and adjacent areas of the guinea-pig brain. Brain Res., sous presse.
- TRAMU G., BEAUVILLAIN J.C. et DUBOIS M.P. (1974 a) : Cytologie adénohipophysaire du Lérot à diverses périodes du cycle annuel. Etude en immunofluorescence et microscopie électronique. J. Physiol. (Paris) 68, 24 B.
- TRAMU G., BEAUVILLAIN J.C. et DUBOIS M.P. (1974 b) : Identification des cellules gonadotropes de l'hypophyse du Lérot (*Elomys quercinus* L.) par une méthode de superposition d'observations de microscopie optique et de microscopie électronique. J. Microscopie 21, 181-184.
- TRAMU G. et DUBOIS M.P. (1972) : Identification par immunofluorescence des cellules à activité LH du cobaye mâle. C.R. Acad. Sci. Paris 275, 1159-1161.
- TRAMU G. et LEONARDELLI J. (1979) : Immunohistochemical localization of enkephalins in median eminence and adenohipophysys. Brain Res. 168, 457-471.
- TRAMU G., LEONARDELLI J. et DUBOIS M.P. (1977) : Immunohistochemical evidence for an ACTH-like substance in hypothalamic LH-RH neurons. Neurosci. Lett. 6, 305-309.

- TRAMU G., PILLEZ A. et LEONARDELLI J. (1978) : An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. J. Histochem. Cytochem. 26, 322-324.
- VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E. et ROSS G.T. (1971) : A method for producing antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33, 988-991.
- VALE W., RIVIER C. et BROWN M. (1977) : Regulatory peptides of the hypothalamus. Ann. Rev. Physiol. 39, 473-527.
- VANCE V.K., SCHNURE J.J. et REICHLIN M. (1968) : Induction of antibodies to porcine ACTH in rabbits with non steroidogenic polymers of BSA and ACTH. In : Protein and polypeptide hormones (Ed. M. MARGOULIES) Int. Congr. Ser. 161, 380-384. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam.
- VANDESANDE F. et DIERICKX K. (1975) : Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. Cell Tissue Res. 164, 153-162.
- VANDESANDE F. et DIERICKX K. (1976) : Immunocytochemical demonstration of separate vasotocinergic and mesotocinergic neurons in the amphibian hypothalamic magnocellular neurosecretory system. Cell Tissue Res. 175, 289-296.
- VAN VUGT D.A., BRUNI J.F., SYLVESTER P.W., CHEN H.T., IEIRI T. et MEITES J. (1979) : Interaction between opiates and hypothalamic dopamine on prolactin release. Life Sci. 24, 2361-2368.
- VARGA J.M., MOELLMANN G., FRITSCH P., GODAWSKA E. et LERNER A.B. (1976) : Association of cell surface receptors for melanotropin with the Golgi region in mouse melanoma cells. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 73, 559-562.
- VAUDRY H., OLIVER C., JEGOU S., LEBOULENGER F., TONON M.C., DELARUE C., MORIN J.P. et VAILLANT R. (1978 a) : Immunoreactive melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) in the brain of the frog (*Rana esculenta* L.). Gen. Comp. Endocrinol. 34, 391-401.
- VAUDRY H., TONON M.C., DELARUE C., VAILLANT R. et KRAICER J. (1978 b) : Biological and radioimmunological evidence for melanocyte stimulating hormones (MSH) of extrapituitary origin in the rat brain. Neuroendocrinology 27, 9-24.
- WAMSLEY J.K., YOUNG W.S. et KUCHAR M.J. (1980) : Immunohistochemical localization of enkephalin in rat forebrain. Brain Res. 190, 153-174.
- WATSON S.J., AKIL H., SULLIVAN S. et BARCHAS J.D. (1977 a) : Immunocytochemical localization of methionine enkephalin : preliminary observations. Life Sci. 21, 733-738.
- WATSON S.J., BARCHAS J.D. et LI C.H. (1977 b) : β -lipotropin : localization of cells and axons in rat brain by immunocytochemistry. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5155-5158.
- WATSON S.J., RICHARD C.W. et BARCHAS J.D. (1978) : Adrenocorticotropin in rat brain : immunocytochemical localization in cells and axons. Science 200, 1180-1182.
- WEBER E., MARTIN R. et VOIGT K.H. (1979) : Corticotropin/ β -endorphin precursor : concomitant storage of its fragments in the secretory granules of anterior pituitary corticotropin/endorphin cells. Life Sci. 25, 1111-1118.

WEBER E., VOIGT K.H. et MARTIN R. (1978 a) : Granules and Golgi vesicles with differential reactivity to ACTH antiserum in the corticotroph of the rat anterior pituitary. Endocrinology 102, 1466-1474.

WEBER E., VOIGT K.H. et MARTIN R. (1978 b) : Concomitant storage of ACTH and endorphin-like immunoreactivity in the secretory granules of anterior pituitary corticotroph. Brain Res. 157, 385-391.

WEBER E., VOIGT K.H. et MARTIN R. (1978 c) : Pituitary somatotrophs contain (Met) enkephalin-like immunoreactivity. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 6134-6138.

WONG D.T. et HORNG J.S. (1973) : Stereospecific interaction of opiate narcotics in binding of ³H-dihydromorphine to membranes of rat brain. Life Sci. 13, 1543-1556.

YALOW R.S. et BERSON S.A. (1971) : Size heterogeneity of immunoreactive human ACTH in plasma and in extracts of pituitary gland and ACTH producing thymoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 439-445.

YANG H.Y., HONG J.S. et COSTA E. (1977) : Regional distribution of leu and met-enkephalin in rat brain. Neuropharmacology 16, 303-307.

ZIMMERMAN A.E. et KRAICER J. (1978) : Multiple forms of ACTH biological activity in the pars intermedia of the rat adenohypophysis. Life Sci. 22, 1451-1461.

ZIMMERMAN E.A., LIOTTA A. et KRIEGER D.T. (1978) : β -lipotropin in brain : localization in hypothalamic neurons by immunoperoxidase technique. Cell Tiss. Res. 186, 393-398.

*Cette Thèse a été
imprimée sur Offset
par
le Service Polycopie
de l'ASSOCIATION CORPORATIVE
des ETUDIANTS EN MEDECINE DE
LILLE*