

50376  
1986  
269

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376  
1986  
269

Année Universitaire 1986-1987

Thèse N° 75

**THÈSE**

présentée à

**L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR**

**DE L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE**

**MENTION : BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE**

par

**Olivier TRANCHANT**



**LOCALISATION RADIOAUTOGRAPHIQUE DES ARN  
MESSAGERS DE L'UTÉROGLOBINE PAR  
HYBRIDATION *IN SITU* ET DES RÉCEPTEURS DE  
LA PROGESTÉRONE DANS  
DIVERS ORGANES CHEZ LA LAPINE**

soutenue le 5 décembre 1986, devant la Commission d'examen

JURY

Président : Monsieur P. GUILBAULT  
Directeur de Thèse : Mademoiselle M. WAREMBOURG  
Rapporteurs : Monsieur M. ATGER  
Monsieur M. PORCHET

à mes parents

à ma femme

Le travail a été réalisé à l'Unité 156 INSERM, Place de Verdun, à Lille.  
(Directeur : Professeur M. Mazzuca).

Je tiens à remercier vivement :

Mlle Warembourg

qui a dirigé mes recherches, je lui suis particulièrement reconnaissant de m'avoir accueilli dans le laboratoire et d'avoir été l'animateur de cette formation par la recherche. Qu'elle veuille bien trouver dans ce travail, l'expression de mes remerciements.

Mr Atger

pour sa contribution précieuse à ce travail et qui accepte de faire partie de mon jury.

Mr le Professeur Guilbault

J'ai pu bénéficier de ses conseils tout au long de mes études je le remercie d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Mr le Professeur Porchet

qui me fait l'honneur d'examiner ce travail.

L'ensemble du personnel de l'Unité 156 Inserm et tout particulièrement Mlle Fremaux qui a assuré la dactylographie du manuscrit.

L'Institut Supérieur d'Agriculture (ISA) et la Faculté Libre des Sciences (F.L.S.) qui m'ont permis d'effectuer ce travail.

## Résumé

L'ARN messenger codant pour l'utéroglobine a été localisé chez la lapine dans la corne utérine et dans le poumon après hybridation in situ. Les sections de tissus fixées à l'alcool acide acétique ont été hybridées à l'ADN complémentaire marqué au tritium. Les séquences hybridées ont été détectées par radioautographie. Des expériences "contrôles" utilisant l'ADN tritié du pBR 322 démontrent la spécificité du marquage observé. Dans le poumon, l'ARN messenger de l'utéroglobine présent en faible concentration a pu être clairement localisé après traitement des coupes à la Nucléase  $S_1$ .

Dans les cornes utérines de la lapine gestante, l'ARN messenger de l'utéroglobine visualisé par des grains d'argent, a été trouvé dans l'épithélium de l'endomètre. La concentration est plus importante dans les cellules de l'épithélium glandulaire que dans les cellules de l'épithélium de surface. Le marquage est réparti dans le cytoplasme. Pratiquement toutes les cellules épithéliales contiennent des ARN messagers de l'utéroglobine. Par contre, on en observe très peu dans les épithéliums de la corne utérine chez la lapine non gestante.

Dans le poumon, une rétention élevée de radioactivité se trouve dans les cellules ciliées de l'épithélium des bronches et des bronchioles alors que les cellules à mucus apparaissent non marquées. Certaines cellules bordant les canaux alvéolaires et les alvéoles du parenchyme pulmonaire montrent un léger marquage. Aucune différence dans la répartition des grains d'argent n'a été observée dans le poumon chez la lapine gestante ou non gestante. Des essais de localisation des ARN messagers de l'utéroglobine ont été également réalisés dans la vessie et l'appareil digestif.

Dans le tractus génital, la progestérone a une influence sur le mécanisme de sécrétion de l'utéroglobine, aussi la distribution de la progestérone a été étudiée par radioautographie dans l'utérus et le vagin, mais également dans la vessie et l'appareil digestif. Des cellules cibles de la progestérone ont été localisées plus spécialement dans le tractus génital (corne utérine, endocol, vagin) mais aussi dans la musculuse de la vessie. De nombreux récepteurs de la progestérone sont présents dans la paroi des vaisseaux sanguins principalement situés dans le myomètre de l'utérus.

Ces résultats illustrent l'intérêt de la technique d'hybridation in situ pour localiser des cellules codant pour une protéine. Ils montrent que les cellules épithéliales de la corne utérine chez la lapine gestante de 5 jours sont riches en ARNm de l'utéroglobine alors que les récepteurs de la progestérone sont principalement localisés dans les cellules du chorion à proximité des épithéliums de surface et glandulaire. Ce travail peut contribuer à une meilleure connaissance de la régulation par la progestérone de la synthèse de l'utéroglobine chez la lapine.

Mots clefs :

ARNm de l'utéroglobine  
Récepteurs de la progestérone  
Hybridation in situ  
Radioautographie  
Lapine



4 - Radioautographie et coloration des coupes.	17
5 - Comptage.	18

<u>RESULTATS</u>	19
------------------	----

A - Localisation des ARN messagers de l'utéroglobine dans la corne utérine.	20
---	----

I - Chez la lapine gestante de 5 jours.	21
---	----

II - Chez la lapine non gestante.	23
-----------------------------------	----

III - Chez la lapine prépubère.	24
---------------------------------	----

1) non traitée aux stéroïdes.	24
-------------------------------	----

2) traitée aux stéroïdes.	24
---------------------------	----

B - Localisation des ARN messagers de l'utéroglobine dans le poumon.	26
--	----

I - Chez la lapine gestante de 5 jours.	26
---	----

II - Chez la lapine non gestante.	28
-----------------------------------	----

III - Chez la lapine prépubère traitée à l'oestradiol.	30
--	----

C - Essais de détection des ARN messagers de l'utéroglobine dans différents organes chez la lapine à 5 jours de gestation.	30
--	----

I - Tractus génital.	30
----------------------	----

1) Endocol.	30
-------------	----

2) Trompe.	31
------------	----

3) Vagin.	31
-----------	----

II - Vessie.	31
--------------	----

III - Appareil digestif.	31
--------------------------	----

1) Oesophage.	31
---------------	----

2) Intestin (Duodénum - Colon).	31
---------------------------------	----

3) Foie.	32
----------	----

<u>DISCUSSION</u>	33
-------------------	----

CHAPITRE II DETECTION DES RECEPTEURS DE LA PROGESTERONE DANS DIFFERENTS ORGANES  
CHEZ LA LAPINE PAR LA TECHNIQUE RADIOAUTOGRAPHIQUE. 39

INTRODUCTION 40

MATERIELS ET TECHNIQUES 45

- 1 - Hormones utilisées. 46
- 2 - Préparation du traceur radioactif. 46
- 3 - Matériel Biologique. 46
- 4 - Prélèvement des tissus et congélation. 47
- 5 - Préparation des radioautographies. 47
  - Préparation des lames. 47
  - Montage du film. 47
  - Adhérence des coupes sur les lames émulsionnées. 47
- 6 - Exposition des radioautographies. 48
- 7 - Fixation, développement et coloration des coupes. 48

RESULTATS 49

- A - Localisation des récepteurs de la progestérone dans le tractus génital. 50
  - 1 - utérus 50
    - . corne utérine 50
    - . endocol 50
  - 2 - vagin 51
- B - Essai de détection des récepteurs de la progestérone dans les poumons. 52
- C - Détection des récepteurs de la progestérone dans la vessie. 52
- D - Expérience contrôle dans des organes considérés comme non cibles. 53
  - duodénum, oesophage.



DISCUSSION

54

CONCLUSION GENERALE

59

BIBLIOGRAPHIE

61

## INTRODUCTION GENERALE

L'utéroglobine, aussi appelée blastokinine, est une protéine composée de deux sous unités de 71 acides aminés chacune (Popp et coll., 1978 ; Ponstingl et coll., 1978 ; Atger et coll., 1980a). Son poids moléculaire est approximativement de 10 000 (Atger et Milgrom, 1977). Elle est particulièrement localisée dans l'utérus de la lapine (Beier, 1966 ; 1967a et b ; Krishnan et Daniel, 1967 ; Johnson, 1972 ; Kirchner, 1976a et b). Une augmentation croissante de son taux a été observée du 1er au 4ème jour de la gestation, (Beier, 1968 ; Daniel, 1976 ; Kao et Bullock, 1981) suivie d'une diminution progressive jusqu'au 9ème jour à partir duquel l'utéroglobine devient difficilement détectable (Beier, 1976). Cette protéine a également été trouvée dans d'autres tissus : système génital mâle, poumon, intestin, par des méthodes biochimiques (Kirchner et Schroer, 1976 ; Feigelson et coll., 1977 ; Beier et coll., 1980) et immunohistochimiques (Noske et Feigelson, 1976 ; Noske et Gooding, 1978 ; Beier et coll., 1978 ; El Etreby et coll., 1983). Des traces d'un antigène présumé identique à l'utéroglobine ont été détectées par immunoélectrophorèse dans des fragments de vagin, de vessie et de duodénum (Noske et Feigelson, 1976 ; Noske et Gooding, 1978).

Bien que son rôle physiologique ne soit pas clairement démontré, la capacité de l'utéroglobine à se lier à la progestérone a été confirmée à l'aide de préparations d'utéroglobine purifiées (Beato et Beier, 1975 ; Beato, 1976 ; Fridlansky et Milgrom, 1976 ; Beato et coll., 1977). Cette propriété a permis plusieurs hypothèses. Cette protéine pourrait agir comme un transporteur de stéroïde (Beato, 1977) et alors, elle maintiendrait une concentration élevée de progestérone dans la lumière utérine de la lapine (Bockshani et Kirchner, 1981). En s'associant à la progestérone, l'utéroglobine protégerait l'embryon du stéroïde exogène (Whitten, 1957 ; Daniel et Levy, 1964 ; Roblero, 1973). L'hypothèse initiale selon laquelle l'utéroglobine serait indispensable pour la préimplantation de l'embryon (Krishnan et Daniel, 1967 ; Gulyas et coll., 1969 ; El-Banna et Daniel, 1972a et b) n'est pas admise par Maurer et Beier (1976). Le rôle de l'utéroglobine sur le développement de l'embryon n'est pas confirmé (Beier et coll. 1980). Comme l'utéroglobine ne semble pas uniquement synthétisée dans l'endomètre, sa présence dans d'autres tissus devrait être considérée dans les futures investigations s'intéressant à son rôle physiologique.

Les progrès considérables réalisés ces dernières années en biologie moléculaire permettent actuellement de détecter des séquences d'acides nucléiques dans des tissus par des techniques d'hybridation. Celles-ci consistent en la réassociation d'un brin d'ADN complémentaire radioactif (sonde spécifique) soit avec le brin d'ADN correspondant soit avec son ARN messager. La méthode employée dépend du problème à résoudre. S'il s'agit de la localisation d'un ARNm sur des coupes de tissus on effectue l'hybridation in situ, s'il s'agit de la quantification de séquences d'ARNm et de l'étude partielle de son organisation on utilise l'hybridation in vitro. Ainsi, l'analyse de l'ARNm de l'utéroglobine hybridé avec son ADNc a pu être réalisée dans l'endomètre et le poumon de même que l'étude de sa concentration sous l'effet de différents traitements hormonaux (Savouret et coll., 1980 ; Loosfelt et coll., 1981a et b). Dans ces travaux utilisant des techniques d'hybridation en solution, l'endomètre est considéré dans son ensemble, et il est alors difficile de savoir si la réponse hormonale est la même pour tous les constituants tissulaires. Aussi, seules les hybridations in situ sont capables de localiser les ARNm dans les différents types cellulaires, donc de préciser les lieux de synthèse de l'utéroglobine, ce qui présente également un avantage sur les techniques immunocytochimiques.

Le but du travail présenté dans le premier chapitre a été d'étudier la distribution des ARN messagers de l'utéroglobine dans plusieurs organes chez la lapine au moyen de la technique d'hybridation in situ. Cette étude a été entreprise en collaboration avec l'Unité 135 INSERM (Bicêtre) qui nous a fourni les sondes tritiées (sondes spécifiques : ADNc <sup>3</sup>H de l'ARNm de l'utéroglobine et sondes non spécifiques : ADN <sup>3</sup>H du plasmide pBR 322 pour les expériences contrôles).

Jusqu'à présent, l'utéroglobine a été mise en évidence chez un seul mammifère : le lapin aussi bien mâle que femelle. La régulation hormonale de sa sécrétion est différente selon les tissus. Dans la corne utérine, la synthèse de l'utéroglobine est contrôlée par la progestérone (Bullock et coll., 1976 ; Atger et Milgrom, 1977 ; Feigelson et coll., 1977). Celle-ci apparaît avoir un double effet ; elle induit l'ARN messager de l'utéroglobine et pourrait exercer une régulation secondaire post transcriptionnelle non identifiée (Loosfelt et coll., 1981a). La progestérone produit une augmentation trois fois plus élevée de la concentration d'utéroglobine par rapport à celle de ses ARNm tandis que l'oestradiol augmente, dans des proportions identiques, la concentration d'utéroglobine et celle de ses ARNm (Loosfelt et coll., 1981b). En revanche, dans le poumon, ni la sécrétion d'utéroglobine, ni la concentration de ses ARNm ne sont influencées par l'oestradiol ou la progestérone (Savouret et coll., 1980).

La progestérone intervenant dans la régulation de l'utéroglobine et de ses ARN messagers dans certains tissus, il nous a semblé intéressant de détecter si les cellules riches en ARN messagers de l'utéroglobine pouvaient correspondre chez la lapine aux cellules cibles de la progestérone. Aussi, nous avons entrepris la localisation radioautographique des récepteurs de la progestérone dans les organes où la présence des ARNm de l'utéroglobine avait été envisagée. Les résultats de cette étude ont fait l'objet du deuxième Chapitre.

CHAPITRE I

DETECTION DES  
ARN MESSAGERS DE L'UTEROGLOBINE  
DANS DIFFERENTS ORGANES CHEZ LA  
LAPINE PAR HYBRIDATION IN SITU.

**INTRODUCTION**

L'ARN messenger de l'utéroglobine a été purifié (Atger et Milgrom, 1977), l'ADN complémentaire a été synthétisé (Atger et coll., 1980a ; Savouret et coll., 1980) et introduit dans un plasmide (Atger et coll., 1980b, 1981). Par clonage, on obtient ainsi de nombreux plasmides contenant chacun une molécule d'ADN complémentaire. Ces ADNc sont marqués au tritium par coupure substitution ("nick-translation"). Dans la technique d'hybridation in situ que nous avons mise au point, les ARNm de l'utéroglobine hybridés aux ADNc<sup>3</sup>H sont localisés sur nos coupes de tissus par radioautographie. Dans ce travail, la méthode d'hybridation in situ d'Hudson et coll. (1981) a été retenue après plusieurs essais et comparaisons avec d'autres protocoles expérimentaux (D.E.A. Tranchant, 1982). Il a fallu cependant l'adapter à notre matériel et apporter certaines modifications en vue d'obtenir le marquage spécifique optimum sur nos radioautographies. Lors de la mise au point de la technique dans le laboratoire, plusieurs problèmes se sont posés comme : le choix du fixateur, la quantité de milieu de préhybridation et d'hybridation à déposer sur nos coupes, la composition la durée et la température des lavages. La plupart d'entre eux ont été résolus au cours du D.E.A. (Tranchant, 1982) notamment la mise au point de lavages suffisamment puissants pour déstabiliser les hybrides non spécifiques sans provoquer le décollement des sections. Plus récemment, des améliorations ont encore été apportées à la méthodologie comme le traitement à la nucléase S<sub>1</sub>. Cette enzyme qui a pour but d'éliminer les séquences d'ADNc<sup>3</sup>H incorrectement hybridées a permis de réduire considérablement le marquage non spécifique. Les coupes hybridées sont ensuite recouvertes par une mince couche d'émulsion photographique. Cette dernière est développée après un temps d'exposition des radioautographies plus ou moins long et les hybrides ARNm-ADNc peuvent être visualisés par les grains d'argent. Cette méthode d'hybridation in situ nous a donné des résultats satisfaisants, ces quatre dernières années (Warembourg et coll., 1985a et b, 1986a).

La localisation des ARN messagers de l'utéroglobine dans la corne utérine et le poumon a été étudiée chez la lapine prépubère, chez la lapine à 5 jours de gestation et chez la lapine non gestante. Espérant pouvoir détecter des variations d'ARNm de l'utéroglobine, nous avons également essayé d'hybrider des coupes de corne utérine et de poumon de lapines prépubères traitées aux stéroïdes. Des essais de détection d'ARNm de l'utéroglobine ont été entrepris dans d'autres organes (endocol, trompe, vagin, vessie, oesophage, duodénum et colon) prélevés uniquement chez la lapine gestante de 5 jours. Afin de vérifier la spécificité des hybrides ARNm-ADNc formés, des expériences contrôles sont effectuées sur des coupes adjacentes de tissus au moyen d'un ADN radioactif



non complémentaire de l'utéroglobine. L'appréciation du marquage a été faite d'après des observations microscopiques et des microphotographies à partir desquelles une évaluation approximative du nombre des ARNm de l'utéroglobine dans les types cellulaires est possible par quantification des grains d'argent. Pour nous permettre d'apprécier les limites de la technique, des coupes de foie ont été hybridées, car dans cet organe, la concentration en ARNm de l'utéroglobine a été évaluée approximativement au 1/1000ème de celle mesurée dans l'endomètre de la lapine gestante de 5 jours (Atger et coll., 1980a).

La première partie de cette thèse décrit tout d'abord la technique d'hybridation in situ et expose ensuite les résultats obtenus qui ont fait récemment l'objet d'une publication (Warembourg et coll., 1986b).

## MATERIELS ET TECHNIQUES

## I - Obtention des sondes spécifiques d'ADNc <sup>3</sup>H et des sondes contrôles non spécifiques d'ADN <sup>3</sup>H du plasmide pBR 322.

Ces différentes sondes nous ont été fournies par le Laboratoire du Professeur Milgrom (U 135 INSERM, Bicêtre). Comme la préparation de ces sondes n'est pas le but de notre travail, dans ce paragraphe, nous n'en exposerons que très brièvement les principales étapes d'élaboration d'après les publications des auteurs. (Atger et Milgrom, 1977 ; Atger et coll., 1980 a et b ; Atger et coll., 1981) (schéma 1).

### 1 - Synthèse de l'ADNc à l'ARNm (schéma 1, phase A)

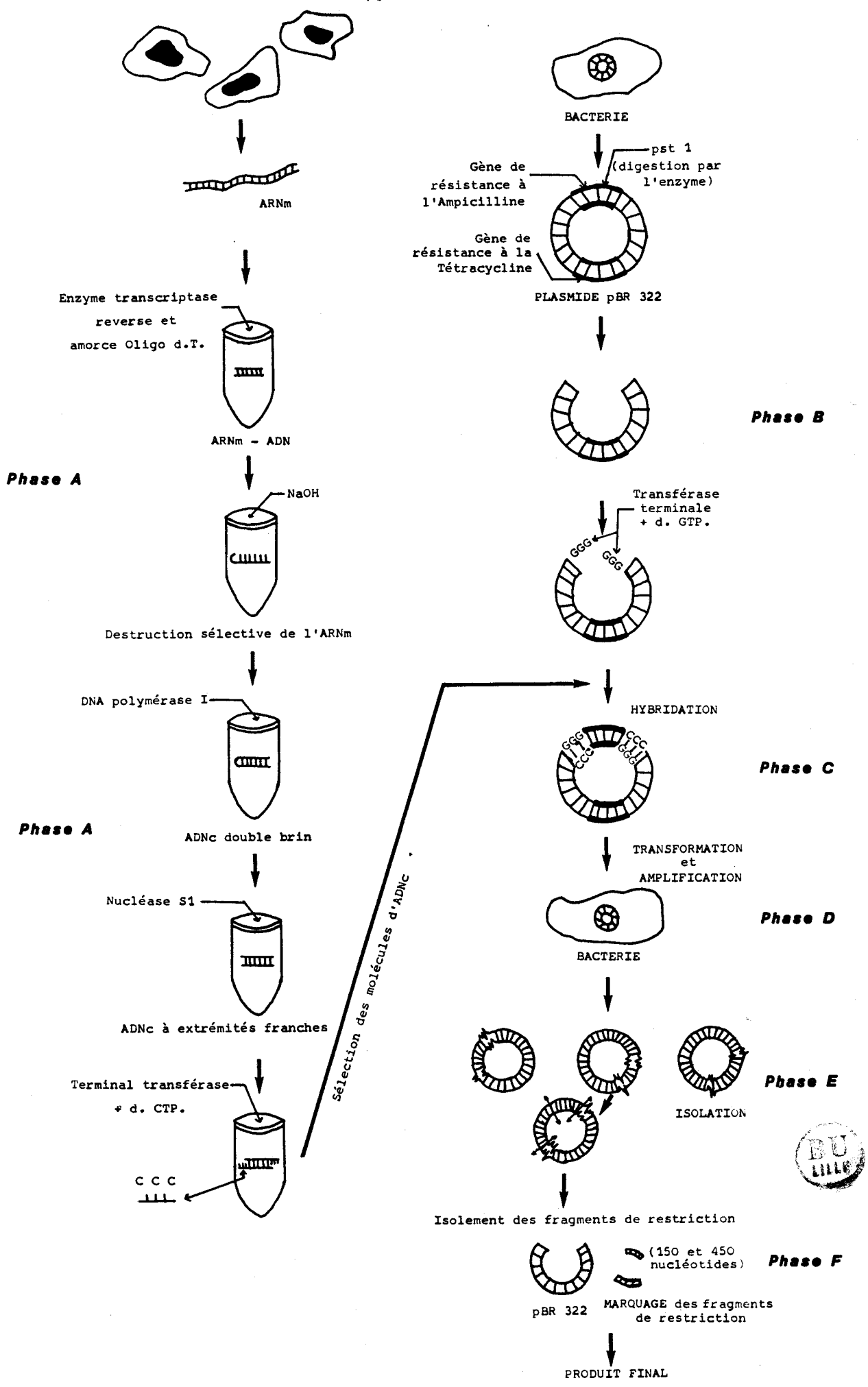
L'ARN messenger est extrait à partir de l'endomètre de la lapine au 5ème jour de la gestation et purifié. Cet ARN messenger est incubé avec des désoxyribonucléotides triphosphates en présence d'une transcriptase inverse. Une molécule hybride ARN messenger-ADN complémentaire est alors obtenue. L'ARNm est hydrolysé et l'ADN complémentaire récupéré par chromatographie. La formation d'un court segment autocomplémentaire qui s'est replié en crochet sert d'amorce pour la synthèse du deuxième brin d'ADN. L'ADN polymérase I est utilisé pour cette synthèse de l'ADN anticomplémentaire. La nucléase S1 ouvre l'extrémité en épingle à cheveu et élimine cette boucle. On obtient alors une molécule d'ADN bicaténaire. L'ADN double brin est allongé à chaque extrémité 3' OH de résidus désoxyribonucléotidiques C (poly dC ; c = cytosine) par action de la transférase terminale.

### 2 - Préparation de l'ADN d'un plasmide (schéma 1, phase B)

Le plasmide pBR 322 contient deux gènes dont les produits d'expression confèrent aux bactéries la résistance aux antibiotiques ampicilline et tetracycline. Le site de coupure par l'enzyme de restriction Pst I est situé dans le gène de l'ampicilline. Le pBR 322 est linéarisé par digestion par Pst I.

### 3 - Confection du plasmide recombinant (schéma 1, phase C)

Le pBR 322 ainsi linéarisé possède deux extrémités qui peuvent servir



d'amorce à une enzyme, la transférase terminale, dont la propriété est de polymériser des désoxyribonucléotides triphosphates. Ainsi la molécule du plasmide incubée avec la transférase terminale en présence de d GTP (désoxyribonucléotides G triphosphates ; G= guanine) se trouve prolongée à ses deux extrémités 3' OH par des séquences monofilaires de poly-dG. On a de la même façon ajouté sur la molécule d'ADN complémentaire des séquences monofilaires de poly-dc-. Si maintenant, on met en présence les molécules d'ADN et de plasmide ainsi allongées respectivement avec le poly-dc et le poly-dG, les portions monofilaires complémentaires vont s'apparier entre elles, refermant ainsi la molécule d'ADN selon une structure circulaire.

#### 4 - Transformation d'une bactérie, amplification du plasmide hybride (schéma 1, phase D)

Des bactéries (*Escherichia coli*) avec des parois cellulaires auparavant fragilisées sont transformées par intégration des plasmides hybrides dans leur cytoplasme. Une fois introduite, la molécule recombinante se multiplie grâce au système de réplication du vecteur. Après amplification de plusieurs millions de fois, chaque molécule donne naissance à un clone, c'est-à-dire à une population de plasmides génétiquement homogènes et qui propagent un fragment déterminé. Les colonies tétracyclines résistantes et ampicillines sensibles sont isolées.

#### 5 - Isolement du plasmide hybride amplifié (schéma 1, phase E)

La lyse des colonies d'*Escherichia coli* permet l'isolation des plasmides hybrides.

#### 6 - Marquage isotopique des fragments de restriction (schéma 1, phase F)

Après digestion par PstI, les fragments de restriction correspondant à l'ADN complémentaire de l'utéroglobine sont isolés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Ces fragments (150 et 450 nucléotides) sont uniformément marqués au tritium par coupure-substitution (nick-translation) de la façon suivante : 1 µg d'ADN est marqué au tritium par incubation 20 mn à 14°C dans 100 µl d'une solution contenant 50mM Tris HCl, pH 7.6, 5mM chlorure magnésium, 2mM dithiothreitol, 100 µCi de <sup>3</sup>H d ATP (Act. Spec. 13 Ci/mmmole), 100 µCi de <sup>3</sup>H dCTP (Act. Spec. 26 Ci/mmmole), 100 µCi de <sup>3</sup>H dGTP (Act. Spec. 11 Ci/mmmole), 100 µCi de <sup>3</sup>H dTTP (Act. Spec. 107 Ci/mmmole) et 20 unités d'ADN polymérase I (Boehringer). L'incorporation est suivie par précipitation d'aliquotes avec de

l'acide trichloracétique 10% à différents temps d'incubation. Lorsque celle-ci atteint son maximum, la réaction est arrêtée par addition de 20mM edta, 0,1% SDS. L'ADN marqué est alors chromatographié par passage sur une colonne de Sephadex G 75 équilibrée en 10mM Tris HCL pH 7,6, 1mM edta, 100mM NaCl. L'activité spécifique des sondes ainsi préparées est de l'ordre de  $8 \times 10^6$  dpm/ $\mu$ g d'ADN.

### 7 - Nature des sondes non spécifiques

Les sondes non spécifiques, qui ont servi pour nos expériences contrôles, sont composées de fragments d'ADN marqué au tritium comme précédemment, qui proviennent du plasmide pBR 322 mais qui ne sont pas complémentaires de l'ARNm de l'utéroglobine. La taille de ces sondes d'ADN  $^3\text{H}$  est de 75 à 1632 nucléotides.

## II - Technique d'hybridation in situ pour localiser l'ARN messager de l'utéroglobine à partir de l'ADNc $^3\text{H}$

### 1 - Matériel biologique

Quinze lapines New-Zealand (Charles Rivers France) sont utilisées : cinq lapines gestantes de  $3 \pm 0,5$  kg au 5<sup>ème</sup> jour de la gestation (le jour 0 étant celui de l'accouplement et le jour 5 celui du sacrifice), deux lapines non gestantes de même poids et huit lapines prépubères de  $1 \pm 0,2$  kg. Six des lapines prépubères reçoivent quotidiennement une injection sous cutanée, soit de 5  $\mu$ g, soit de 250  $\mu$ g d'oestradiol (Roussel Uclaf) ou de 5 mg de progestérone (Roussel Uclaf) dans 0,5 ml d'huile de sésame (Sigma) pendant 6 jours avant le sacrifice tandis que les 2 autres ne reçoivent que l'huile de sésame. Les animaux sont sacrifiés par décapitation. Les organes (corne utérine, poumon, endocol, trompe, vagin, vessie, oesophage, duodénum, colon et foie) sont alors disséqués le plus rapidement possible et découpés en fragments.

### 2 - Préparation des tissus

#### a) Fixation

Les pièces sont fixées à 4°C pendant 20 heures dans le mélange alcool-acide acétique suivant : 3 volumes d'alcool absolu pour 1 volume d'acide

acétique. Elles sont deshydratées à température ambiante pendant 17 heures dans l'alcool à 95° (2 bains), pendant 45 heures dans l'alcool absolu (3 bains) puis passées dans 3 bains de toluène de 1 heure chacun.

#### b) Inclusions et coupes

Après inclusion des pièces dans la paraffine (Paraplast Lancer) à 56°C (premier bain pendant 2 heures, deuxième bain pendant 4 heures), elles sont débitées au microtome en coupes de 6 µm d'épaisseur. Ces dernières sont étalées avec de l'albumine sur des lames microscopiques préalablement gélatinées (le traitement des lames est exposé ci-après dans le paragraphe 3a). Une ou plusieurs coupes sont déposées sur les lames.

#### c) Déparaffinage et déshydratation des coupes

Les coupes sont déparaffinées par passages successifs dans le toluène (3 bains de 10 minutes), dans l'alcool absolu (2 bains de 10 minutes) et dans l'alcool à 95° pendant 15 minutes. Elles sont alors séchées pendant quelques secondes à température ambiante avant l'hybridation.

### 3 - Technique d'hybridation in situ

#### a) Préparation des instruments et de la verrerie

Des gants stériles sont nécessaires pour toute manipulation de l'ADN. Tout le matériel en contact avec cet ADN (bêchers, aimants, cônes, pipettes, lamelles, pincettes, aiguilles montées etc...) est auparavant siliconé (solution de silicone, Serva ; prête à l'emploi) et stérilisé durant 90 minutes à 180°C pour le verre, 20 minutes à 110°C pour le matériel plastique. Pour l'obtention de lames gélatinées, des lames microscopiques sont nettoyées pendant plusieurs jours dans l'acide sulfo-chromique, rincées plusieurs fois à l'eau courante, puis à l'eau distillée, passées à l'alcool 70°C pendant 2 à 3 minutes et mises à sécher à 40°C. Les lames propres sont ensuite immergées dans une solution de gélatine à 0,5% contenant 5% d'alun de chrome et mises à sécher à 40°C.

## b) Produits chimiques employés

Les produits utilisés proviennent des sociétés suivantes :

- MERCK (Glycerol, Zn Cl<sub>2</sub>, formamide, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, EDTA, anhydride (phosphorique, gelatine, chlorure de sodium, citrate de sodium).
- SIGMA (ADN de sperme de Hareng, sérum albumine bovine, nucléase S1)
- PHARMACIA FINE CHEMICALS (ficoll 400)
- SERVA (polyvinyl pyrrolidone)
- BOEHRINGER MANNHEIM GmbH (ARN de transfert de levure)
- BDH CHEMICALS Ltd POOL ENGLAND (sodium dodecyl sulfate : SDS).

## c) Préparation des différentes solutions dans le milieu d'hybridation et dans les lavages

- L'eau utilisée pour la préparation de l'ADN pour les milieux de préhybridation et d'hybridation est bidistillée et stérilisée.

- L'ADN complémentaire tritié spécifique de l'ARN messager de l'utéroglobine (sonde spécifique) et l'ADN tritié non spécifique (sonde non spécifique) nous ont été fournis par l'Unité 135 INSERM. Ces sondes par fraction de 10<sup>6</sup> dpm, sont gardées sous forme lyophilisée au laboratoire à - 80°C jusqu'au moment de leurs utilisations : chaque fraction de 10<sup>6</sup> dpm permet l'hybridation sur 10 lames.

- L'ARNt de levure nous a été fourni par ce même laboratoire INSERM car il nécessite une purification par plusieurs extractions au phénol suivies par une extraction par le chloroforme.

- L'ADN de sperme de hareng lyophilisé qui permet de saturer le milieu d'hybridation est préparé à une concentration de 10 mg/ml d'eau stérile. Le mélange est dissout sous agitation continue pendant une nuit à 4°C avant de subir des passages successifs dans des aiguilles de diamètre de plus en plus fin (0,8 mm x 40 mm ; 0,7 mm x 40 mm ; 0,5 mm x 16 mm ; 0,45 mm x 13 mm). Ce processus permet d'obtenir des cassures mécaniques de l'ADN bicaténaire. Des aliquotes de 0,5 ml de cet ADN sont placées dans des tubes stériles. L'ADN est ensuite dénaturé à 100°C pendant 10 minutes puis rapidement refroidi dans la glace pilée et stocké à - 18°C.

- La solution normale de "Denhardt" (0,02% sérum albumine bovine, 0,02% ficoll 400, 0,02% polyvinyl pyrrolidone) est préparée 100 fois concentrée et est stockée par fraction de 0,5 et 4 ml à - 18°C.

- Le tampon 1 x SSC : 150mM NaCl, 15mM citrate de Na à pH 7,0, est



préparé à une concentration de 20 x SSC et stocké au réfrigérateur. Avant chaque utilisation, le pH est vérifié.

- Le tampon de la nucléase S1 : 0,03M citrate de Na, 0,3M NaCl, 0,003M ZnCl<sub>2</sub>, 5% glycérol, ajusté à pH 4,5 avec de l'acide acétique est stérilisé à 180°C pendant 90 minutes.

d) Préhybridation et hybridation d'après la technique d'Hudson et coll. (1981) modifiée

- Dans un premier temps, les tissus subissent une préhybridation. Chaque coupe déshydratée est recouverte par 100 µl de milieu dont la composition est la suivante :

50% formamide

0,5% Na Dod So<sub>4</sub> (SDS : sodium dodecyl sulfate)

50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,2% sérum albumine bovine

0,2% Ficoll 400

0,2% polyvinyl pyrrolidone

} solution de Denhardt x 10

0,1% ADN de sperme de Hareng dénaturé de nouveau 10 minutes à 100°C puis rapidement refroidi dans la glace pilée.

0,1% ARN de transfert de levure

0,6M NaCl

5mM EDTA

Les lames sont immédiatement placées dans une boîte de pétri en atmosphère rendue humide, pendant 2 heures à 40°C. Elles sont ensuite rincées à l'alcool absolu pendant 5 minutes et séchées à température ambiante avant l'hybridation.

- Dans un deuxième temps, cent µl du milieu précédemment énoncé sont ajoutés à la fraction de 10<sup>6</sup> dpm d'ADNc <sup>3</sup>H ou d'ADN <sup>3</sup>H du plasmide pBR 322 ce qui permet une hybridation sur 10 lames. La solution est centrifugée et dénaturée 2 minutes à 100°C puis rapidement refroidie dans la glace. Sur chaque coupe sont déposés 10 µl de sonde spécifique ou non spécifique, ce qui correspond environ à 10<sup>5</sup> dpm soit approximativement 12,5 ng d'ADN <sup>3</sup>H. Une lamelle (1,8 cm x 1,8 cm) siliconée et stérilisée est alors posée sur les coupes et lutée avec une colle à base de gomme latex (Kleer-tak rubber cement Mecanorma). Les lames sont mises à hybrider à 40°C pendant 20 heures en atmosphère humide.

e) Lavages d'après la technique de Maniatis et coll. (1978) modifiée

Après l'hybridation, les lamelles sont délicatement enlevées et les lames sont passées dans différentes solutions :

- quatre lavages de une heure chacun à 68°C dans une solution contenant :

- \* 2 x SSC pH 7,0
- \* 1 x solution de "Denhardt"
- \* 0,1% SDS

- cinquième traitement d'une heure à température ambiante dans la solution suivante :

- \* 2 x SSC pH 7,0
- \* 50% formamide
- \* 0,1% SDS

- sixième lavage de 10 minutes à température ambiante dans :

- \* 0,5 x SSC pH 7,0
- \* 50% formamide

- septième traitement de 15 minutes à température ambiante dans :

- \* 0,2 x SSC pH 7,0

f) Traitement "nucléase S1" appliqué à la plupart des coupes de poumon

L'examen des premières coupes de poumons hybridées, a révélé un marquage trop important. Afin d'y remédier, nous avons employé la nucléase S1. Cette enzyme spécifique des acides nucléiques simple brin est employée afin d'éliminer les extrémités d'ADNc <sup>3</sup>H non appariées à l'ARN messager. Ce traitement a pour effet de diminuer le bruit de fond ; il a alors été systématiquement effectué sur les autres coupes. La nucléase S1 est une métalloprotéine nécessitant la présence d'ion Zn <sup>2+</sup> et ayant une bonne activité à un pH 4,5 environ. Dans 90 ml de tampon "nucléase S1" pH 4,5 sont ajoutés :

- 0,045 mg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé 10 minutes à 100°C puis rapidement refroidi dans de la glace pilée.
- 90 unités/ml de nucléase S1

Les lames sont alors placées dans cette solution pendant une heure à 50°C. Elles subissent ensuite 3 lavages successifs de 10 minutes à température ambiante dans 0,2 x SSC pH 7,0.

Nous signalons que toutes les illustrations concernant le poumon ont été prises à partir de sections traitées par la nucléase S1 à l'exception de la planche V, figure a et de la planche IX, figure a.

#### 4 - Radioautographie et coloration des coupes

##### a) Radioautographie

Après le dernier lavage les coupes sont déshydratées dans l'alcool à 70° (10 minutes) puis dans l'alcool à 95° (10 minutes) et séchées à température ambiante pendant 5 minutes.

Dans un tube borel, l'émulsion nucléaire de type NTB<sub>2</sub> ou NTB<sub>3</sub> (Kodak) est alors diluée de moitié dans l'eau distillée à 40°C en chambre noire. La solution ainsi préparée contient de nombreuses bulles d'air. Afin de les éliminer, des lames propres sont trempées verticalement dans l'émulsion nucléaire et retirées d'un mouvement lent et régulier. Les coupes hybridées sont ensuite émulsionnées de façon identique. Après séchage d'environ 24 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière, les lames sont placées dans une boîte noire étanche en présence d'anhydride phosphorique et stockées à 4°C. La durée d'exposition est contrôlée en prélevant des lames tests à différents intervalles de temps de 21 à 140 jours suivant les organes étudiés. Les coupes sont alors révélées dans du D 19 B Kodak pendant 3 minutes à 20°C, rapidement rincées dans l'eau distillée, fixées dans du thiosulfate de sodium à 30% pendant 5 minutes et enfin lavées pendant 10 minutes dans l'eau distillée.

##### b) Colorations des coupes

Les tissus sont colorés par le vert de méthyle pyronine ou par l'hémalum éosine. Ils sont ensuite deshydratés dans l'alcool absolu (2 bains de 10 minutes) et passés dans du toluène (2 bains de 10 minutes). Les lames sont alors montées avec du l'Eukitt. L'intérêt du vert de méthyle pyronine est de colorer modérément l'émulsion nucléaire ; par contre ce colorant ne permet pas de délimiter avec précision les structures des organes étudiés. Aussi une coloration histologique de Masson a été nécessaire et effectuée sur quelques coupes adjacentes.

## 5 - Analyse quantitative des grains d'argent

Les comptages des grains d'argent sont effectués sur photographies agrandies (G x 1825) avec l'appareil de mesure MPO/AMO1 Kontron aimablement mis à notre disposition par G. Torpier (U 167 INSERM, Lille). Différentes sections d'organes (cornes utérines et poumons), hybridées lors d'une même expérimentation, provenant d'un même animal et soumises à une exposition radioautographique d'une durée équivalente sont utilisées. Le comptage des grains d'argent est effectué sur les différents types cellulaires d'une même section d'organe. Chaque valeur obtenue représente le nombre de grains d'argent par  $100 \mu\text{m}^2$  de tissu. Pour chaque type cellulaire, une série de 36 valeurs a permis le calcul de la moyenne et de son écart type (valeurs indiquées dans les tableaux 1, 2 et 3 dans les résultats du chapitre I). Par définition, le bruit de fond correspond au nombre de grains d'argent présents sur la lame émulsionnée en dehors de la coupe. Cette mesure du bruit de fond pratiquement négligable a été déduite des valeurs indiquées dans ces tableaux. Par contre les valeurs obtenues dans les cas des hybridations avec l'ADN  $^3\text{H}$  (sonde non spécifique = sonde contrôle) correspondent au marquage non spécifique. Lorsque la moyenne des grains d'argent après hybridation avec l'ADNc  $^3\text{H}$  est environ 5 fois supérieure à celle obtenue après hybridation avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide, nous pouvons considérer le marquage comme hautement spécifique. Par contre si les rapports entre ces moyennes sont de 1 à 3, il nous est plus difficile d'affirmer la spécificité du marquage.

### Paramètres caractérisant les séries de mesure

- Chaque valeur (X) obtenue représente le nombre de grains d'argent présents par  $100 \mu\text{m}^2$  de tissu.

- La moyenne calculée ( $\bar{X}$ ) est la somme des valeurs X divisée par le nombre n (36) de valeurs.

$$\bar{X} = \sum X / n$$

- "x" est l'écart type d'une valeur à la moyenne

$$x = \bar{X} - X$$

- La variance  $S^2$  est calculée

$$S^2 = \frac{\sum x^2}{n - 1}$$

Ecart type ou erreur standard S

$$S = \sqrt{S^2}$$

A - Localisation des ARN messagers de l'utéroglobine dans la corne utérine.

Avant d'exposer nos résultats, nous rappellerons rapidement l'organisation de la corne utérine et ses modifications au début de la gestation.

Une coupe transversale de corne utérine montre à l'observation en microscopie photonique 3 types de tuniques. De la lumière vers l'extérieur : l'endomètre, le myomètre et la séreuse.

- L'endomètre est composé d'un épithélium et d'un chorion. L'épithélium de revêtement est de type cylindrique simple ; il s'infléchit par endroit à l'intérieur du chorion. Ce dernier est constitué de tissu conjonctif lâche. Les principaux changements de structure observés chez une lapine gestante de 5 jours au niveau de l'endomètre sont les suivants : les cellules ciliées et sécrétrices se multiplient considérablement, ce qui produit de nombreuses invaginations glanduriformes dans le chorion. Les glandes deviennent très flexueuses, contournées et longues. Enfin, le chorion subit un développement vasculaire important.

- Le myomètre est constitué schématiquement de 3 tuniques musculaires : une couche superficielle externe composée de fibres musculaires lisses longitudinales, une fine couche intermédiaire faite de fibres musculaires lisses circulaires et longitudinales et une couche profonde interne formée de fibres musculaires lisses circulaires. Le myomètre d'une lapine à 5 jours de gestation subit un processus d'hypertrophie. Les fibres musculaires se multiplient et augmentent de taille ainsi que les éléments conjonctifs autour de ces fibres. Le diamètre des vaisseaux sanguins infiltrés dans le myomètre est devenu plus important. Toutes ces modifications contribuent à doubler la paroi musculaire de la corne utérine. Les fibres circulaires et longitudinales de la couche intermédiaire s'entremêlant dans plusieurs directions se confondent facilement avec celles des deux autres formations musculaires. Les résultats obtenus au cours des hybridation in situ seront mentionnés uniquement au niveau des 2 couches principales : externe et interne.

- La séreuse est une tunique fibreuse très fine, enveloppant le myomètre, très peu visible sur nos radioautographies.

## Planche I

Distribution des ARN messagers de l'utéroglobine dans l'endomètre de la corne utérine de la lapine gestante après hybridation in situ avec l'ADNc <sup>3</sup>H (fig a-d).

a et c : Concentration de la radioactivité dans l'épithélium glandulaire (→)  
et dans les cellules épithéliales formant le fond des villosités

ch : chorion

★ : lumière

b et d : Marquage intense sur les glandes profondes.

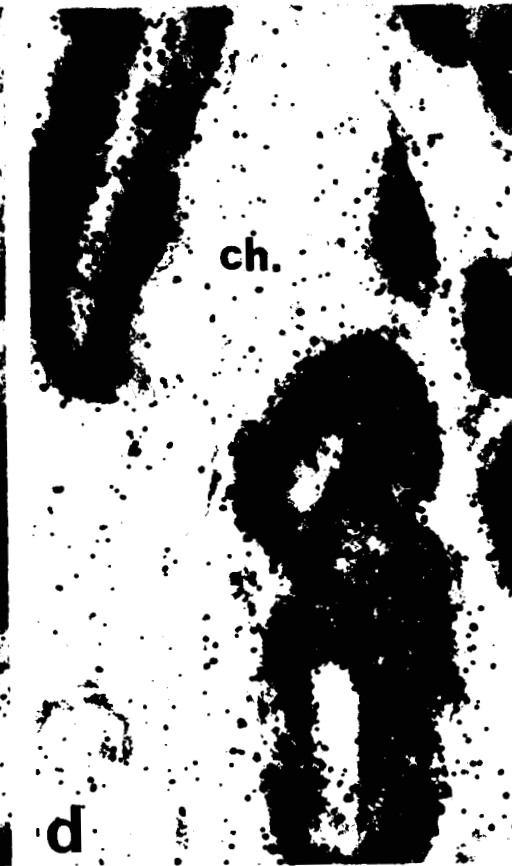
La partie supérieure de la figure b est un agrandissement de la région encadrée fig a.

ch : chorion

a : Temps d'exposition : 36 jours ; (G. X 350)

b : Temps d'exposition : 36 jours ; (G. X 700)

c et d : Temps d'exposition : 36 jours ; (G. X 560)



## I - Chez la lapine gestante de 5 jours

Les résultats préliminaires obtenus, lors du D.E.A., sur la corne utérine sont inclus dans ce paragraphe. D'autres expériences ont permis depuis une analyse plus approfondie à la fois qualitative et quantitative de la distribution des ARN messagers de l'utéroglobine. Leur présence est visualisée dans les cellules marquées par des grains d'argent principalement localisés dans le cytoplasme.

### 1 - l'endomètre

L'augmentation de l'épaisseur de l'endomètre se caractérise par un très grand développement des glandes utérines et des villosités qui, de ce fait, occupent toute la hauteur de l'endomètre. La concentration la plus importante de grains d'argent s'observe tout particulièrement dans l'épithélium des glandes profondes proche du myomètre (Pl. I, fig a-d, Pl. II, fig a, tableau I, fig I). Les invaginations aussi appelées digitations en doigt de gant, qui constituent les villosités sont tapissées d'un épithélium également fortement marqué (Pl. II, fig b et e). Au niveau de ce dernier marquage une légère décroissance est parfois constatée à partir des cellules formant le fond des villosités jusqu'aux cellules proches de la cavité utérine principale. Les ARN messagers sont répartis dans la totalité du cytoplasme des cellules épithéliales glandulaires cependant la partie apicale de certaines d'entre elles est plus particulièrement riche en grains d'argent (Pl. II, fig c).

Quant aux cellules de l'épithélium de surface, bordant la lumière utérine, elles présentent une concentration importante de radioactivité (Pl. II, fig a et e ; tableau I, fig I). Cependant quelques-unes d'entre elles ne sont pas marquées. Le nombre moyen de grains d'argent sur l'ensemble des cellules de cet épithélium est inférieur à celui relevé au niveau des cellules épithéliales glandulaires (tableau I, fig I).

Après hybridation avec l'ADNc  $^3\text{H}$ , les épithéliums de surface et glandulaire sont respectivement 5 à 7 fois plus marqués que les mêmes types cellulaires après hybridation avec l'ADN  $^3\text{H}$  non complémentaire de l'utéroglobine (tableau I, fig I). Après incubation des coupes avec l'ADN  $^3\text{H}$  du pBR 322, les images de marquage précédemment décrites ne sont plus retrouvées ni sur les épithéliums glandulaire (comparer Pl. II, fig c et d) ni sur l'épithélium de surface (comparer Pl. II, fig e et f). Les analyses quantitatives confirment ces différentes observations (tableau I, fig I). Le marquage très intense observé sur les épithéliums peut donc être considéré comme spécifique.

Contrairement aux épithéliums, très peu de grains d'argent apparaissent dans le chorion. De plus, ils sont uniformément dispersés sur les éléments



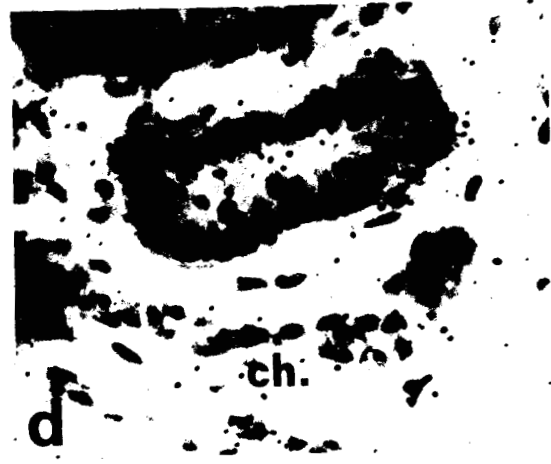
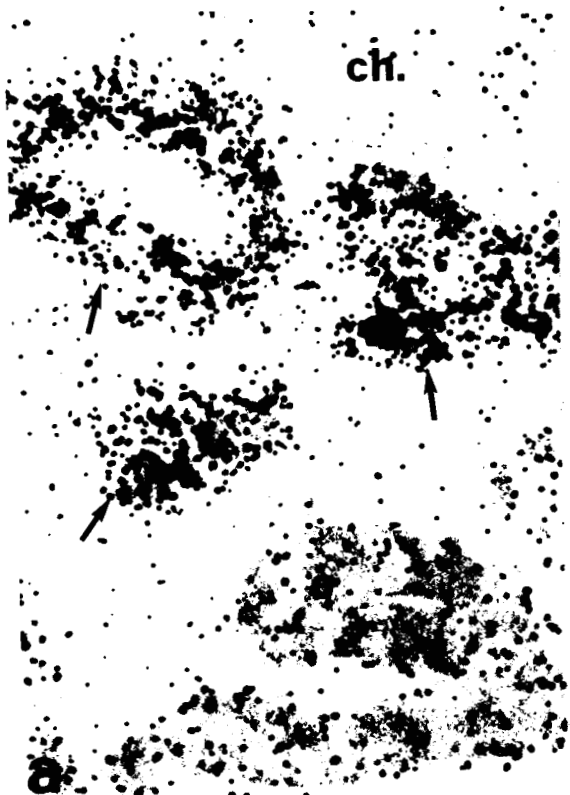
## Planche II

Radioautographies de l'endomètre de la corne utérine de la lapine gestante après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$  (fig a, b, c et e) et après hybridation in situ avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide pBR 322 (fig d et f).

- a : Concentration plus importante des ARN messagers sur l'épithélium glandulaire (→) que sur l'épithélium de surface (e).  
temps d'exposition : 21 jours ; (G. X 560)
- b : Radioautographie montrant le marquage des digitations en doigt de gant de l'épithélium de surface.  
temps d'exposition : 36 jours ; (G. X 350)
- c et d : Sections adjacentes de glandes utérines.  
On note une concentration importante de grains d'argent, essentiellement cytoplasmique (noyau : n→) après hybridation avec l'ADNc  $^3\text{H}$  (fig c) et l'absence de marquage spécifique sur la coupe contrôle (fig d).  
temps d'exposition : 21 Jours ; (G. X 700)
- e et f : Comparaison du marquage de l'épithélium de surface et des villosités après hybridation in situ avec la sonde spécifique (fig e) ou après incubation avec la sonde contrôle (fig f).  
temps d'exposition : 21 jours ; (G. X 700)

★ : lumière

ch : chorion



BU  
JULY

Tableau 1

Distribution des grains d'argent dans les différents tissus de la corne utérine de la lapine gestante de 5 jours après hybridation in situ avec l'ADNc <sup>3</sup>H de l'utéroglobine ou l'ADN <sup>3</sup>H du plasmide pBR 322.

T I S S U S		Lapines Gestantes	
		Sonde spécifique ADNc <sup>3</sup> H	Sonde non spécifique ADN <sup>3</sup> H du pBR 322
Endomètre	épithélium glandulaire	24,5 ± 5,9 *	3,3 ± 0,9
	épithélium de surface	15,0 ± 2,9	3,6 ± 0,9
	chorion	5,6 ± 1,7	1,8 ± 0,8
Myomètre	muscle circulaire interne	8,3 ± 1,9	3,3 ± 1,0
	muscle longitudinal externe	4,0 ±	1,7 ± 0,67

\* Chaque valeur est la moyenne des grains d'argent par 100 µm<sup>2</sup> de tissu ± écart type.  
Temps d'exposition des radioautographies : 21 jours.

Figure 1 : Histogramme représentant la moyenne des grains d'argent exprimées dans le Tableau 1.

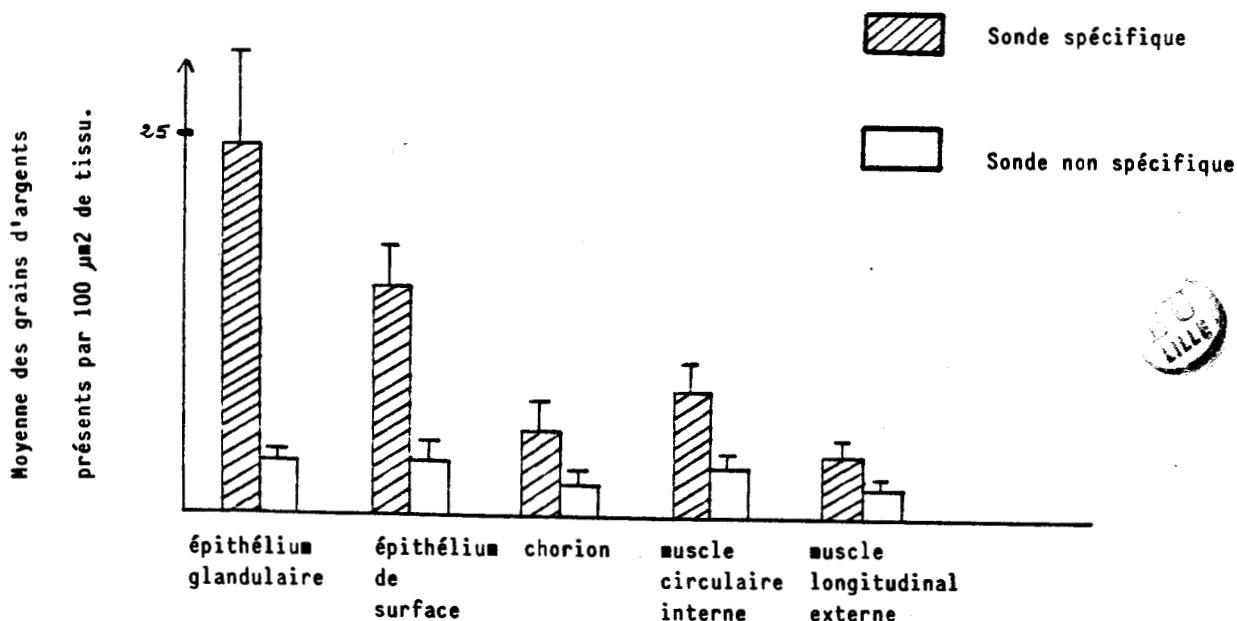
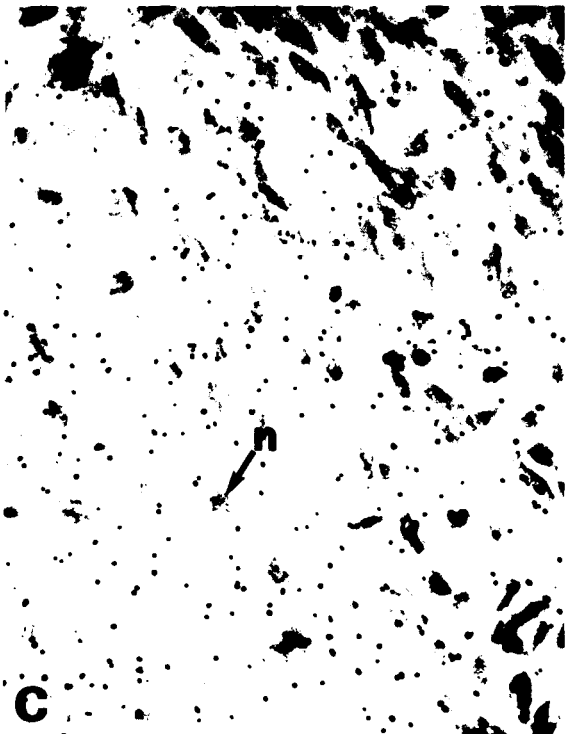
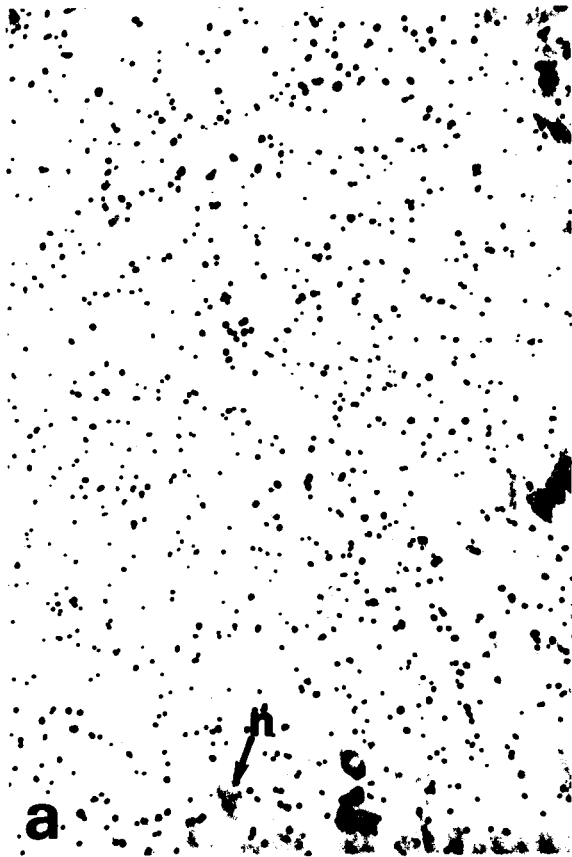


Planche III

Radioautographies du myomètre de la corne utérine de la lapine gestante après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$  (fig a et b) et après hybridation in situ avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide pBR 322 (fig c et d).

- a : Fibres musculaires circulaires internes.
- b : Fibres musculaires longitudinales externes.
- c : Section contrôle - Fibres musculaires circulaires internes.
- d : Section contrôle - Fibres musculaires longitudinales externes.

a-d : temps d'exposition : 21 jours ; (G. X 700)  
noyau de la fibre : n →



BTU  
1943

constituant la couche sous épithéliale tel que : les cellules réticulaires et fusiformes, les fibres de réticuline et les vaisseaux sanguins (Pl. I, fig a-d; Pl. II, fig c ; Tableau I, figure 1).

## 2 - Le myomètre

La radioactivité présente sur les fibres musculaires lisses circulaires internes (Pl. III, fig a) et sur les fibres longitudinales externes (Pl. III, fig b) est beaucoup moins importante que sur les cellules épithéliales de l'endomètre (tableau I, fig I). Bien qu'uniforme dans son intensité pour une même couche musculaire, le marquage est supérieur dans le muscle circulaire interne (tableau I, fig I). Il nous a semblé après observation d'un grand nombre de coupes que les grains d'argent étaient préférentiellement localisés sur le cytoplasme des fibres musculaires. Cependant, après hybridation avec l'ADN  $^3\text{H}$  (Pl. III, fig a et b) ou après incubation avec la sonde contrôle (Pl. III, fig c et d), le rapport entre les moyennes de grains d'argent par 100  $\mu\text{m}^2$  de tissu n'est que de 2,5. Il nous apparaît bien faible pour plaider en faveur d'un marquage spécifique au niveau du myomètre.

## II - Chez la lapine non gestante

### 1 - l'endomètre

A l'inverse de la lapine gestante l'endomètre de la lapine non gestante de poids équivalent, est nettement moins développé. L'épithélium de surface a peu d'invaginations, les glandes sont rares et leurs branches de divisions sont en petit nombre. Les grains d'argent, peu nombreux, s'observent principalement sur le cytoplasme des cellules épithéliales glandulaires et dans quelques cellules isolées de l'épithélium de surface (Pl. IV, fig. a).

En comparant ce marquage avec celui précédemment décrit chez la lapine gestante, on constate, au niveau des mêmes types cellulaires des épithéliums que les moyennes des grains d'argent par 100  $\mu\text{m}^2$  sont beaucoup plus faibles. Le rapport entre les valeurs obtenues avec la sonde spécifique (Pl. IV, fig a) ou avec la sonde non spécifique (Pl. IV, fig. b) est de l'ordre de 2 à 2,5 pour les épithéliums (tableau II, fig. II). La distribution non uniforme des grains d'argent peut laisser supposer que certaines cellules épithéliales sont marquées spécifiquement. Par contre, le faible marquage, uniformément réparti dans le chorion ne semble pas indiquer la présence d'ARN messenger de

## Planche IV

Radioautographies de la corne utérine de la lapine non gestante (fig a, b et c) et de lapine prépubère (fig d).

a : Localisation de la radioactivité dans l'endomètre après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$ .

e : épithélium de surface

ch : chorion

★ : lumière

b : Section de l'endomètre après hybridation in situ avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide pBR 322.

c : Fibres musculaires circulaires internes du myomètre après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$ .

d : Endomètre de lapine prépubère après hybridation avec l'ADNc  $^3\text{H}$ .

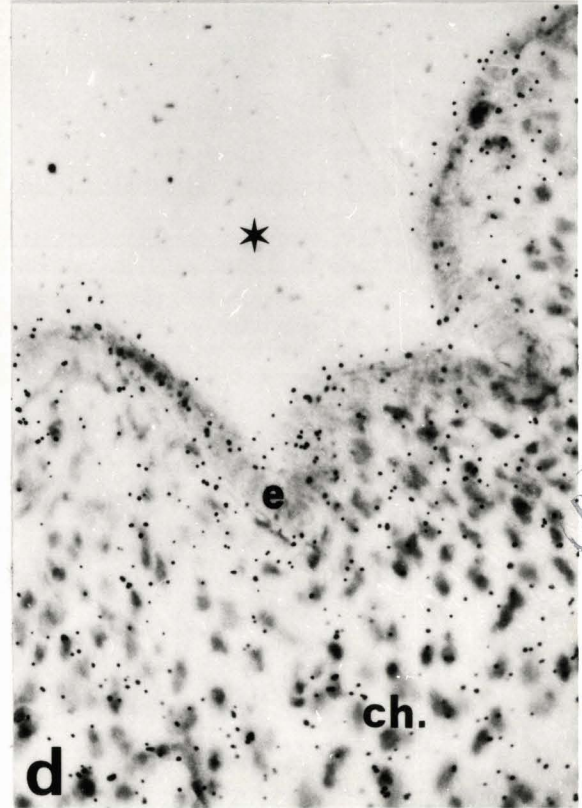
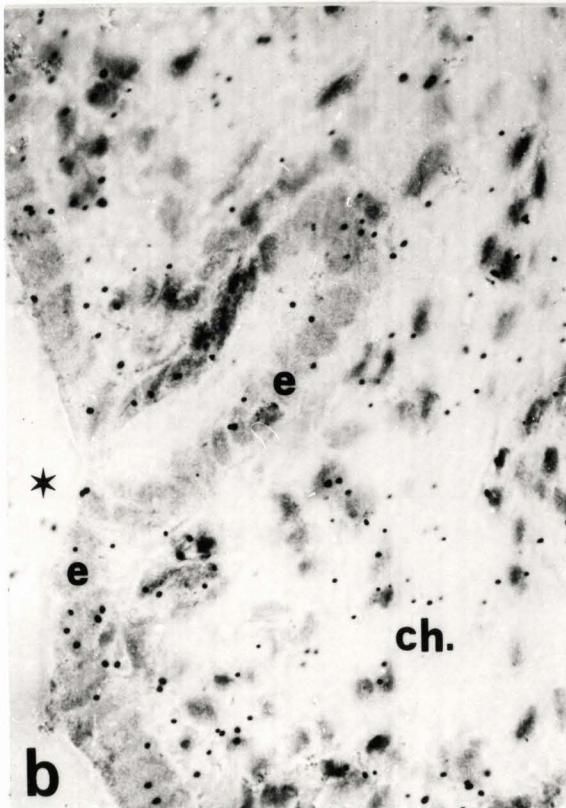
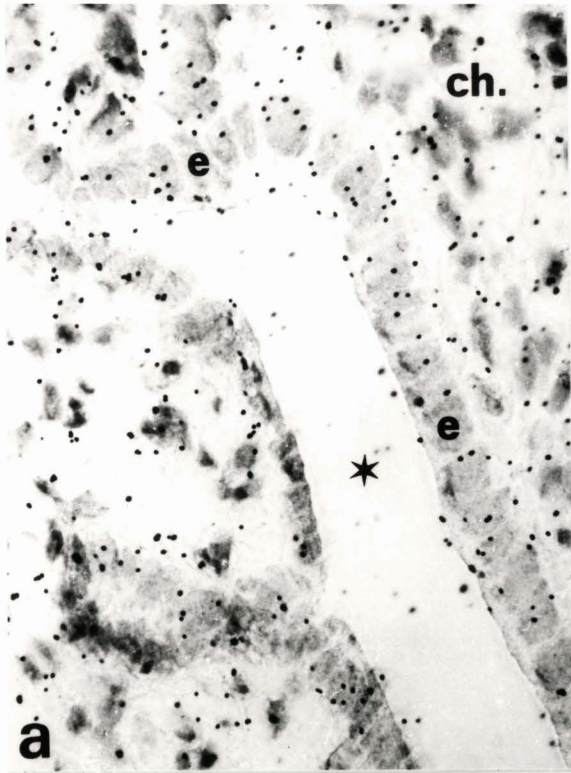
e : épithélium de surface

ch : chorion

★ : lumière

a, b et c : temps d'exposition : 21 jours ; (G. X 700)

d : temps d'exposition : 147 jours ; (G. X 560)



BU  
MIL



l'utéroglobine (Pl. IV, fig. a).

## 2 - le myomètre

Quelle que soit la sonde utilisée, spécifique (Pl. IV, fig. c) ou contrôle, très peu de grains d'argent sont observés sur les fibres musculaires du myomètre. De plus, le faible rapport entre les moyennes obtenues après incubation avec l'ADN  $^3\text{H}$  (tableau II, fig II) ne permet pas de conclure à un marquage spécifique.

## III - Chez la lapine prépubère

### 1 - non traitée aux stéroïdes

Chez la lapine prépubère, le diamètre de la corne utérine est de 5 à 10 fois plus petit que celui de la lapine gestante de 5 jours. Après 150 jours d'exposition des préparations, temps 5 fois plus long que nécessaire pour les coupes de lapine gestante ou non gestante, seulement quelques grains d'argent sont dispersés sur l'ensemble de l'endomètre et du myomètre (Pl. IV, fig. d). Aucun marquage spécifique n'a été décelé.

### 2 - traitée aux stéroïdes

L'administration d'oestradiol (faible dose ou forte dose) ou de progestérone aurait dû provoquer un effet sur la concentration en ARN messenger de l'utéroglobine. Quel que soit le stéroïde et la dose injectée, les coupes de corne utérine présentent la même intensité de marquage malgré un temps d'exposition de 150 jours. Les grains d'argent sont uniformément dispersés sur l'endomètre et le myomètre. On peut cependant noter que les coupes apparaissent plus marquées que celles observées chez les lapines prépubères non traitées. Il semble difficile de détecter et de mettre en évidence, par hybridation in situ, des variations d'ARN messagers en petite quantité.

Tableau 2

Distribution des grains d'argent dans les différents tissus de la corne utérine de la lapine non gestante après hybridation in situ avec l'ADNc <sup>3</sup>H de l'utéroglobine ou l'ADN <sup>3</sup>H du plasmide pBR 322.

T i s s u s		Lapines non gestantes	
		Sonde spécifique ADNc <sup>3</sup> H	Sonde non spécifique ADN <sup>3</sup> H du pBR 322
Endomètre	épithélium glandulaire	3,8 ± 0,73 *	1,7 ± 0,56
	épithélium de surface	3,0 ± 0,72	1,3 ± 0,45
	chorion	2,8 ± 0,77	1,4 ± 0,49
Myomètre	muscle circulaire interne	2,5 ± 0,65	1,9 ± 0,62
	muscle longitudinal externe	2,1 ± 0,48	1,5 ± 0,44

\* Chaque valeur est la moyenne des grains d'argent présents par 100 µm<sup>2</sup> de tissu ± écart type  
Temps d'exposition des radioautographies : 21 jours.

Figure 2 : Histogramme représentant les moyennes des grains d'argent exprimées dans le tableau 2

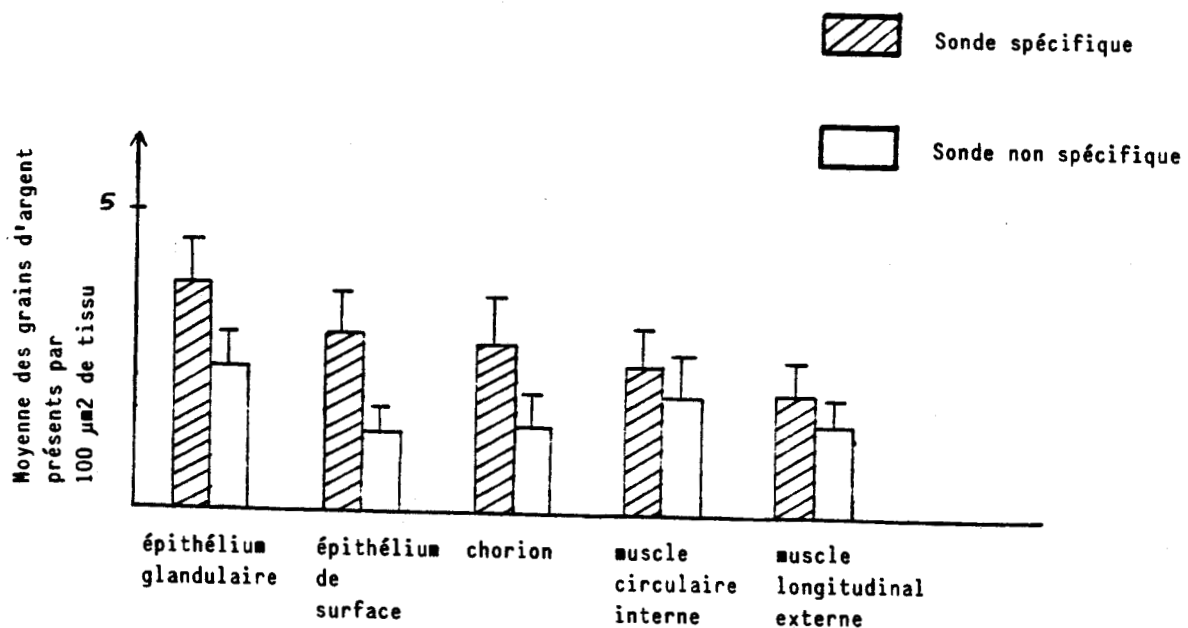


Planche V

Radioautographies de bronchioles du poumon de la lapine gestante après hybridation in situ avec l'ADNc <sup>3</sup>H.

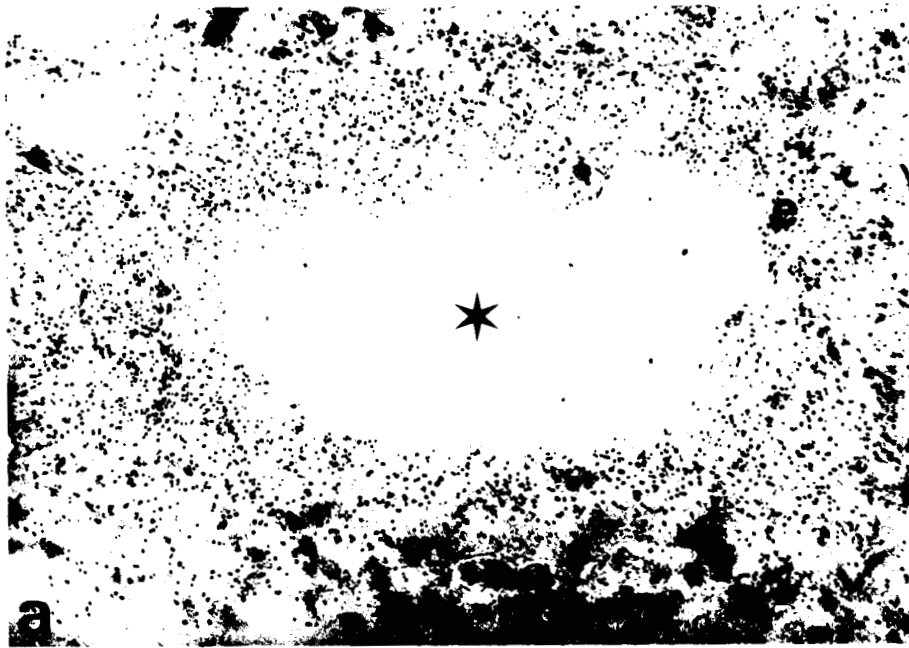
a : coupe ayant subi les lavages habituels sans traitement à la nucléase S1.

b : coupe ayant subi les lavages habituels suivis par un traitement à la nucléase S1.

e : épithélium

★ : lumière

a et b : temps d'exposition : 66 jours ; (G. X 575).



DU  
VILLE

## B - Localisation des ARN messagers de l'utéroglobine dans le poumon

### I - Chez la lapine gestante de 5 jours

#### 1 - Les bronches

La paroi épaisse des bronches est formée de deux tuniques : l'une externe fibro-élastique, l'autre interne constituant la muqueuse. Cette dernière donne sur une lumière irrégulière du fait de la présence de nombreux plis de l'épithélium prismatic et pseudo-stratifié. Quelle que soit la région du poumon observée, un marquage important apparaît sur cet épithélium.

Au cours des premières expériences, nous avons rencontré des difficultés dans l'analyse des radioautographies du poumon dues à une forte accumulation de grains d'argent (Pl. V, fig. a). Aussi, il a été nécessaire d'améliorer la qualité du marquage. Après de nombreux essais, le traitement de nos sections à la nucléase  $S_1$ , à la suite des lavages habituels, s'est avéré donner des résultats assez satisfaisants en réduisant considérablement le marquage non spécifique (Pl. V, fig. b). Les résultats énoncés dans les paragraphes I et III sont décrits à partir de lames traitées à la nucléase  $S_1$ .

Les ARN messagers de l'utéroglobine sont présents dans certains types cellulaires de l'épithélium des voies respiratoires. Les cellules ciliées, prédominantes, étroites avec un noyau allongé en position basale, montrent de nombreux grains d'argent (Pl. VI, fig. a et b). Les cellules caliciformes beaucoup plus volumineuses qui sécrètent un mucus épais ne sont pas marquées. Elles s'intercalent entre les cellules ciliées dans une proportion de une pour cinq mais peuvent aussi se retrouver en groupe (Pl. VI, fig. c).

Les cellules à la base de l'épithélium dites "basales ou de remplacement" qui ne sont jamais en contact avec la lumière présentent aussi des grains d'argent. Le marquage est principalement localisé sur le cytoplasme périnucléaire de l'ensemble des cellules marquées. Sur les cellules épithéliales ciliées et basales, la moyenne des grains d'argent présents par  $100 \mu m^2$  de tissu est environ 6 fois plus importante après hybridation avec l'ADNc  $^3H$  qu'avec l'ADN  $^3H$  du plasmide (tableau III, fig. III) ; (Pl. VII ; comparer fig. a et b).

Au contraire, les autres structures de la bronche telles que : le chorion (Pl. VII, fig. a), le muscle de Reissessen constitué de faisceaux de fibres lisses circulaires (Pl. VII, fig. c), les pièces cartilagineuses sous forme de

Planche VI

Localisation des ARN messagers de l'utéroglobine dans le poumon de la lapine gestante après hybridation in situ avec l'ADNc <sup>3</sup>H.

a, b et c : Epithélium des bronches

→ : cellules ciliées

e : épithélium

ch : chorion

m : muscle de Reissessen

→ : cellules caliciformes

★ : lumière

a et c : temps d'exposition ; 70 jours ; (G. X 560)

b : temps d'exposition ; 70 jours ; (G. X 700)



BU  
MILE

nodules allongés (Pl. VII, fig. d) ne sont pas spécifiquement marquées (Tableau III, fig. III).

## 2 - Les bronchioles

Les ARN messagers de l'utéroglobine sont présents dans de nombreuses cellules épithéliales des bronchioles aussi bien festonnées que terminales (Pl. VIII, fig. a-c). Ces bronchioles subissent progressivement des changements de structure par rapport aux bronches précédemment décrites. Le cartilage disparaît et l'épithélium se réduit à une seule rangée de cellules. Bien que plusieurs types cellulaires aient été caractérisés en microscopie électronique au niveau de cet épithélium, nous ne pouvons distinguer en microscopie optique, sur nos radioautographies, que des cellules épithéliales cubiques et des cellules caliciformes. Ces dernières qui ne sont visibles que dans les bronchioles festonnées ne présentent aucun marquage tandis que les cellules cubiques renferment de nombreux grains d'argent parfois plus concentrés au pôle apical. Comme précédemment pour les bronches, le tissu sous épithélial des bronchioles ne contient que très peu de grains d'argent.

L'épithélium des bronchioles est environ six fois plus marqué après hybridation avec l'ADNc  $^3\text{H}$  qu'avec l'ADN  $^3$  du plasmide (Tableau III, fig. III). Les différentes observations et les valeurs dans le tableau III révèlent que la localisation et la concentration en ARN messager de l'utéroglobine sont comparables à celles trouvées dans les bronches (Tableau III, fig. III). On remarque que cette distribution par 100  $\mu\text{m}^2$  des ARN messagers de l'utéroglobine est moins importante que celle trouvée dans les épithéliums de la corne utérine chez la lapine gestante de 5 jours (comparer Tableau I, fig. I avec Tableau III, fig. III).

## 3 - Le parenchyme pulmonaire

Un marquage notable est à signaler sur le parenchyme constitué d'alvéoles pulmonaires étroitement juxtaposées et de canaux alvéolaires. Ces structures présentent une paroi d'épaisseur inégale ; très mince dans les alvéoles proprement dites, elle est relativement épaisse au niveau de l'ouverture des alvéoles dans le canal. Ces crêtes interalvéolaires sont tapissées de cellules épithéliales cubiques reposant sur des fibres élastiques tandis que l'épithélium de revêtement de la paroi alvéolaire mince forme la vraie surface respiratoire. L'endothélium de nombreux capillaires jouxtent la lame basale de cet épithélium.



## Planche VII

Radioautographies des bronches du poumon de la lapine gestante après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$  (fig a, c et d) et après hybridation in situ avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide pBR 322 (fig b).

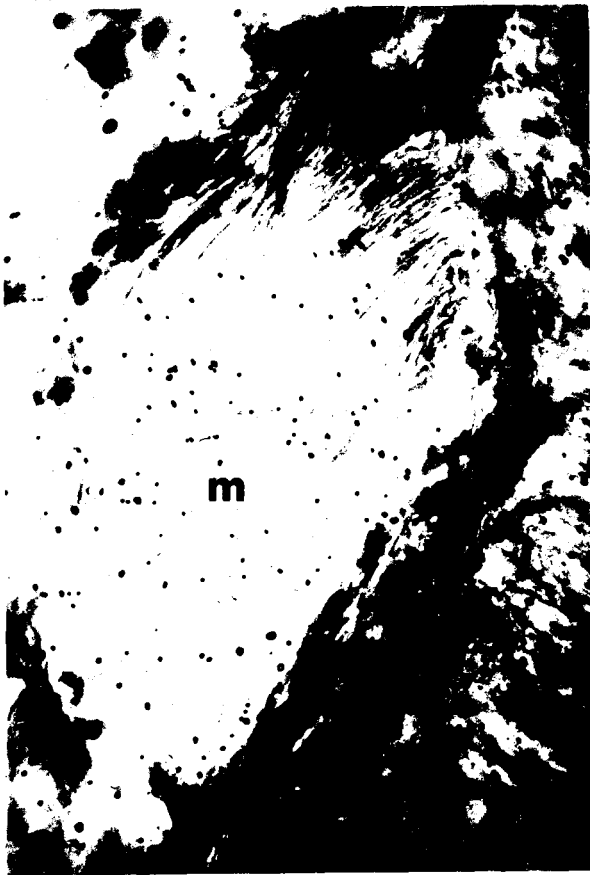
a et b : Comparaison du marquage de l'épithélium (e), du chorion (ch) et du muscle (m) après hybridation avec la sonde spécifique (fig a) ou après incubation avec la sonde contrôle (fig b)

★ : lumière

c : Fibres musculaires lisses du muscle de Reissessen (m).

d : Cartilage hyalin d'une bronche

a-d : temps d'exposition : 70 jours ; (G. X 700).



Bien que l'utilisation de la nucléase  $S_1$  permette une nette amélioration de la qualité du marquage dans le parenchyme, la coloration au vert de méthyle pyronine ne permet pas de distinguer avec précision les différents types cellulaires.

Des grains d'argent sont situés plus particulièrement sur certaines cellules épithéliales des parois alvéolaires après hybridation avec l'ADNc  $^3H$  (Pl. IX, fig. a). Par contre, dans ces régions, très peu de grains d'argent s'observent sur les coupes incubées avec la sonde contrôle (Pl. IX, fig. b). Comparée aux tissus sous épithéliaux des bronches et des bronchioles (tissu sous épithélial, muscle de Reissessen, cartilage), la moyenne des grains d'argent par  $100 \mu m^2$  est plus élevée dans le parenchyme pulmonaire (Tableau III, fig. III). Le rapport entre les moyennes obtenues à partir des coupes hybridées avec l'ADNc  $^3H$  ou avec l'ADN  $^3H$  du plasmide pBR 322 est de 2,5 (Tableau III, fig. III). Bien que ce rapport ne soit pas très élevé le marquage non réparti uniformément permet d'envisager la présence d'ARN messagers de l'utéroglobine dans certaines cellules épithéliales de la paroi des alvéoles.

#### 4 - Les artères pulmonaires

Les artères et artérioles pulmonaires se ramifient parallèlement aux voies respiratoires pour donner naissance au réseau capillaire des parois interalvéolaires. Peu de grains d'argent sont observés, aussi bien sur les coupes hybridées avec l'ADNc  $^3H$  (Pl. IX, fig. c), que sur les sections après incubation avec la sonde non spécifique (Pl. IX, fig. d). Au comptage, le rapport obtenu entre les moyennes est très faible (Tableau III, fig. III) et ne permet pas de déceler un marquage spécifique.

## II - Chez la lapine non gestante

Chez la lapine non gestante, nos premiers résultats provenant de lames de poumon non traitées par la nucléase  $S_1$  montraient un marquage particulièrement intense sur l'épithélium des voies respiratoires (Pl. X, fig. a). Par la suite, après traitement à la nucléase  $S_1$  des sections de poumon, la radioactivité présente la même distribution mais les grains d'argent sont moins nombreux. Ce dernier marquage est identique à celui précédemment décrit chez la lapine gestante. Pour les autres tissus, tels que : le chorion, le muscle de Reissessen, le cartilage des bronches ainsi que le parenchyme, la concentration de la radioactivité est semblable à celle observée chez la lapine gestante.

Planche VIII

Distribution des ARN messagers de l'utéroglobine dans le poumon de la lapine gestante après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$ .

a : Montage d'une bronchiole festonnée montrant une concentration de la radioactivité dans l'épithélium (e).

ch : chorion

★ : lumière

b : Autre bronchiole festonnée.

e : épithélium

c : Accumulation de grains d'argent sur l'épithélium (e) d'une bronchiole terminale.

★ : lumière.

a : temps d'exposition : 70 jours ; (G. X 700)

b : temps d'exposition : 70 jours ; (G. X 350)

c : temps d'exposition : 54 jours ; (G. X 350)



**a**



**b**



**c**

Tableau 3

Distribution des grains d'argent dans les différents tissus de poumons de la lapine gestante de 5 jours après hybridation in situ avec l'ADNc<sup>3</sup>H de l'utéroglobine ou l'ADN<sup>3</sup>H du plasmide pBR 322.

Sondes Tissus	Sonde spécifique ADNc <sup>3</sup> H	Sonde non spécifique ADN <sup>3</sup> H du pBR 322
épithélium des bronches (sauf cellules caliciformes)	9,5 ± 1,80 *	1,6 ± 0,44
épithélium des bronchioles	9,4 ± 2,60	1,6 ± 0,51
parenchyme pulmonaire	3,4 ± 0,78	1,4 ± 0,46
tissu sous épithélial	2,6 ± 0,86	0,8 ± 0,30
muscle de Reissessen	2,1 ± 0,74	1,6 ± 0,43
cartilage des bronches	1,4 ± 0,35	0,9 ± 0,30
artères et artérioles	2,0 ± 0,70	1,2 ± 0,44

\* Chaque valeur est la moyenne des grains d'argent présents par 100 µm<sup>2</sup> de tissu ± écart type  
Temps d'exposition des radioautographies : 70 jours.

Figure 3 : Histogramme représentant les moyennes des grains d'argent exprimées dans le tableau 3

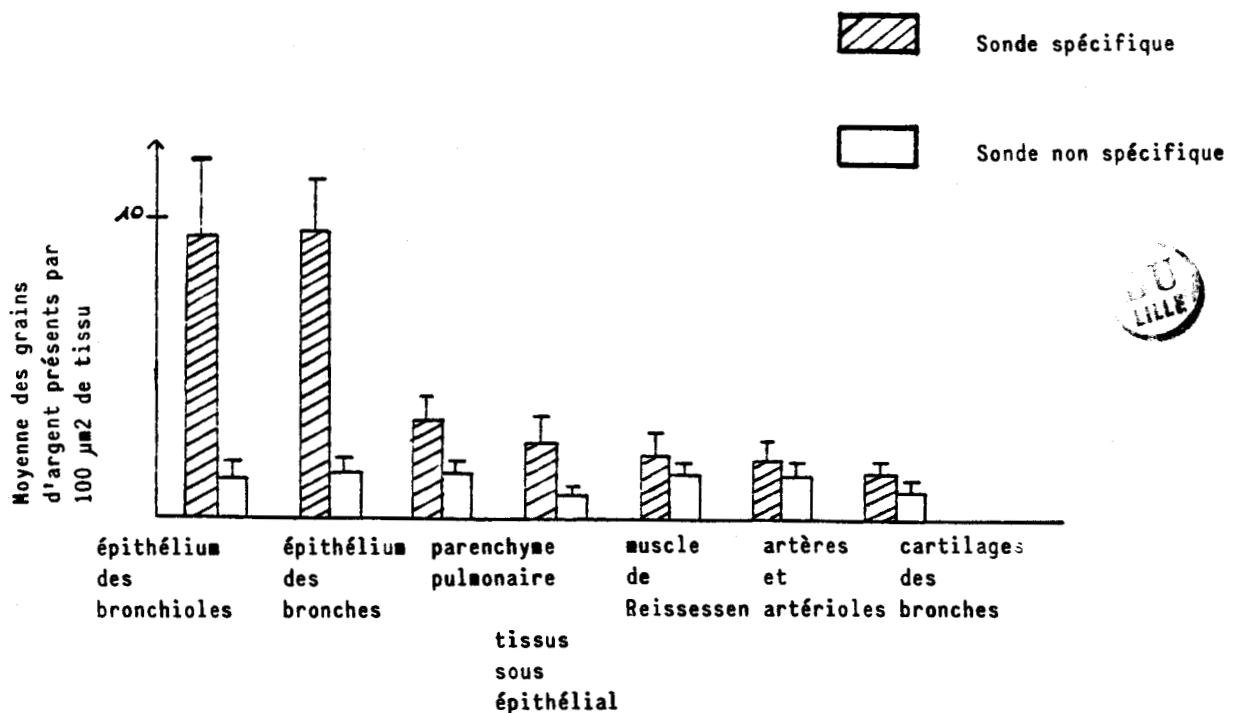


Planche IX

Radioautographies de poumon de la lapine gestante après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$  (fig a et c) et après hybridation in situ avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide pBR 322 (fig b et d).

a : Localisation de la radioactivité sur les parois des alvéoles (a) du parenchyme pulmonaire.

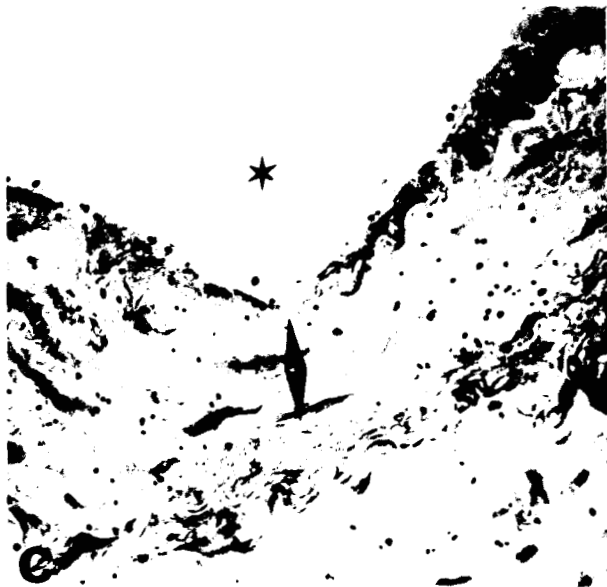
b : Section contrôle du parenchyme pulmonaire.

c : Paroi d'une artère pulmonaire (  )

★: lumière

d : Section contrôle de la paroi d'une artère pulmonaire.

a-d : temps d'exposition : 70 jours ; (G. X 700).





Quelques grains d'argent sont uniformément dispersés sur les coupes contrôles (Pl. X, fig. b).

### III - Chez la lapine prépubère traitée à l'oestradiol

La présence d'ARN messagers de l'utéroglobine est détectée dans l'épithélium des bronches et des bronchioles. Comme pour la lapine gestante, les cellules épithéliales cubiques sont marquées sur l'ensemble du cytoplasme (Pl. X, fig. c). Il faut cependant signaler qu'une exposition plus longue de nos radioautographies (131 jours au lieu de 70 jours pour la lapine gestante) a été nécessaire pour obtenir une densité de grains d'argent pratiquement identique à celle observée chez la lapine gestante. Ce marquage plus difficile à apparaître pourrait signifier un nombre moins important d'ARN messagers de l'utéroglobine chez la lapine prépubère. Sur les autres structures aucun marquage spécifique n'a été détecté à 131 jours. La comparaison du marquage avec les coupes contrôles (Pl. X, fig. d) permet de mettre en évidence la présence d'ARN messagers de l'utéroglobine au niveau de l'épithélium des bronches et des bronchioles chez la lapine prépubère.

### C - Essais de détection des ARN messagers de l'utéroglobine dans différents organes chez la lapine à 5 jours de gestation

#### I - Tractus génital

##### 1) l'endocol

Dans l'endomètre, le marquage de l'épithélium simple de surface est légèrement plus important après hybridation avec l'ADNc  $^3\text{H}$  (Pl. XI, fig. a), qu'après incubation avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide (Pl. XI, fig. b). Les grains d'argent sont essentiellement localisés sur le cytoplasme des cellules épithéliales. On constate une différence importante dans la concentration de la radioactivité entre l'épithélium de l'endocol et celui de la corne utérine. Bien que ces deux organes soient très proches, il semble que le lieu de synthèse de l'utéroglobine soit très localisé. Le chorion, les fibres musculaires du myomètre, aussi bien internes qu'externes ne présentent pas de marquage spécifique.

## Planche X

Radioautographies de poumon de la lapine non gestante (fig a et b) et de lapine prépubère préalablement traitée à l'oestradiol (fig c et d).

a : Concentration de la radioactivité dans l'épithélium (e) d'une bronchiole après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$ . Nous signalerons que cette radioautographie provient de lames de poumons non traitées par la nucléase  $\text{S}_1$  lors des lavages, ce qui vraisemblablement amène un marquage particulièrement intense sur l'épithélium.

★: lumière.

b : Section de bronchiole après hybridation in situ avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide pBR 322.

c : Présence d'ARN messagers de l'utéroglobine dans l'épithélium (e) d'une bronche après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$ .

★: lumière.

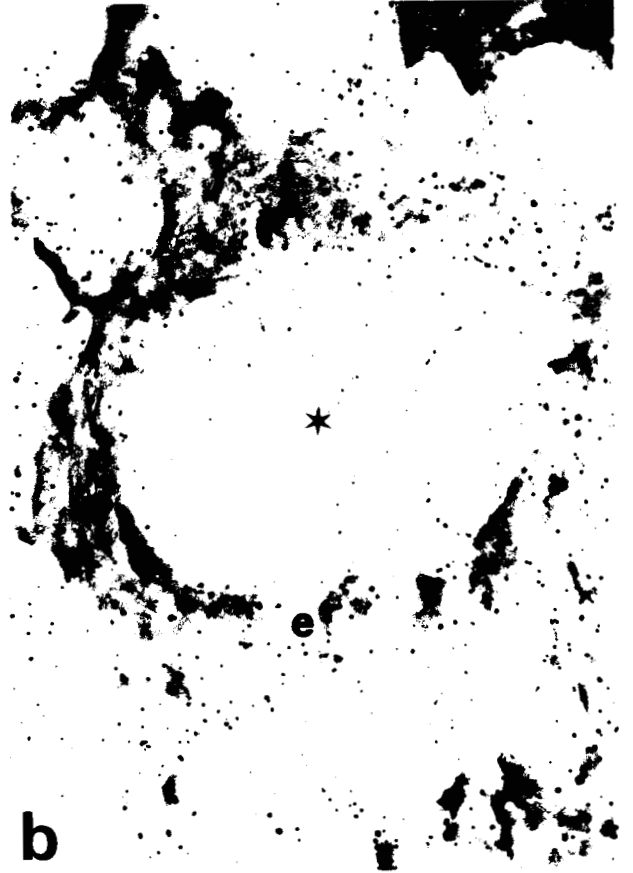
d : Section de bronche après hybridation in situ avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide pBR 322.

a : temps d'exposition : 70 jours : (G. X 560)

b : temps d'exposition : 70 jours ; (G. X 350)

c : temps d'exposition : 140 jours ; (G. X 560)

d : temps d'exposition : 131 jours ; (G. X 560)



## 2) La trompe

Les sections étudiées ont été prélevées dans l'ampoule, partie de la trompe au voisinage de l'ovaire. La faible différence de marquage entre les coupes hybridées avec l'ADNc  $^3\text{H}$  (Pl. XI, fig. c) et les coupes contrôles (Pl. XI, fig. d) ne nous permet pas de conclure à la présence d'ARN messagers de l'utéroglobine.

## 3) Le vagin

Les essais de détection des ARN messagers de l'utéroglobine poursuivis dans l'ensemble du tractus génital n'ont pas donné de résultats positifs dans le vagin.

## II - Vessie

L'épithélium pavimenteux et pluristratifié constituant avec le chorion une muqueuse épaisse et plissée montre de nombreux grains d'argent (Pl. XI, fig. e). Cependant, cette importante concentration de radioactivité ne semble pas correspondre à un marquage spécifique car des grains d'argent s'observent également en grand nombre sur les coupes contrôles (Pl. XI, fig. f).

## III - Appareil digestif

### 1) oesophage

L'épithélium parimenteux et stratifié présente un marquage dont l'intensité diminue de la couche basale vers la lumière. Peu de grains d'argent s'observent sur les cellules superficielles (Pl. XII, fig. a). Après comparaison avec les coupes contrôles (Pl. XII, fig. b), il semblerait que la localisation des grains principalement dans le cytoplasme des cellules épithéliales indique la présence d'ARN messagers de l'utéroglobine. Au contraire, les autres structures de la muqueuse, de la sous muqueuse et de la musculieuse montrent un marquage identique après hybridation avec l'ADNc  $^3\text{H}$  ou après incubation avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide pBR 322.

### 2) Intestin (duodénum - colon)

L'épithélium simple de revêtement, comme toutes les autres structures du duodénum ne sont pas marquées spécifiquement (Pl. XII, fig. c). Les résultats sont également négatifs pour le colon.

## Planche XI

a et b : Radioautographies d'endocol de la lapine gestante. Comparaison du marquage de l'épithélium de surface (e) et du chorion (ch) après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$  (fig a) ou après hybridation in situ avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide pBR 322 (fig b).

c et d : Radioautographies de trompe de la lapine gestante après hybridation avec la sonde spécifique (fig c) ou après incubation avec la sonde contrôle (fig d).

e : épithélium

ch : chorion

★ : lumière

e et f : Radioautographies de vessie de la lapine gestante. On note une concentration importante de grains d'argent aussi bien sur l'épithélium des coupes hybridées avec l'ADNc  $^3\text{H}$  (fig e) que sur celui des coupes hybridées avec l'ADN  $^3\text{H}$  du pBR 322 (fig f).

e : épithélium

ch : chorion

★ : lumière

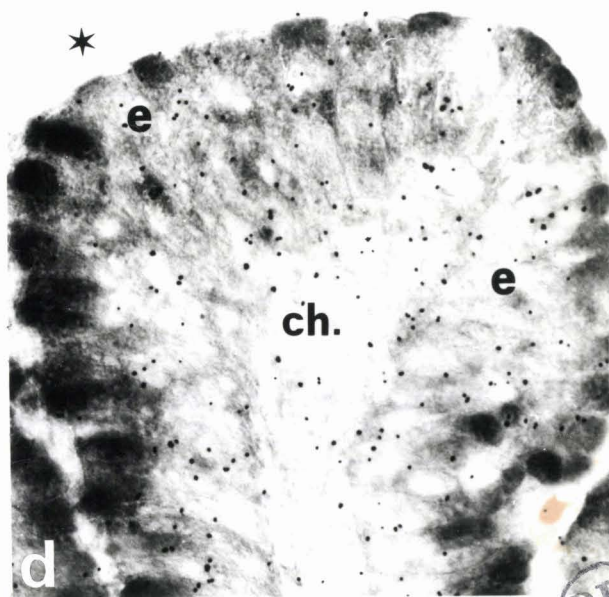
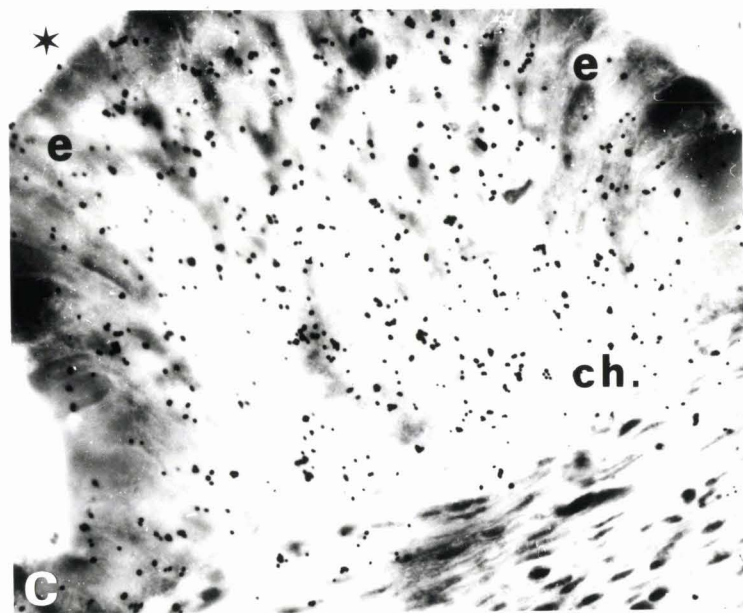
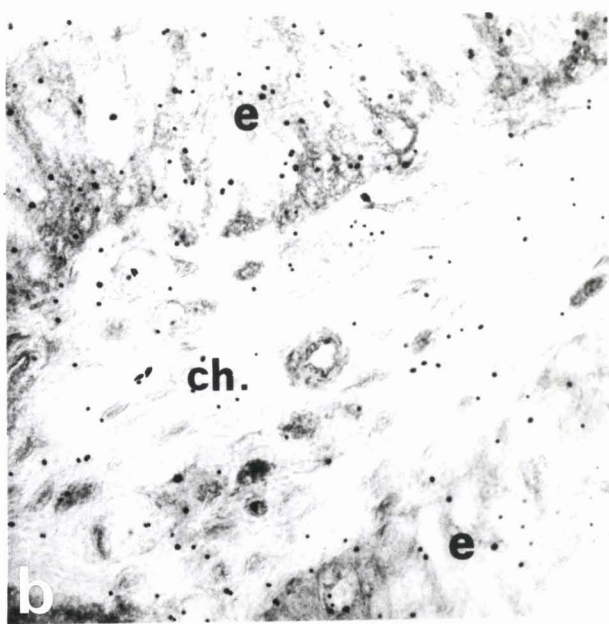
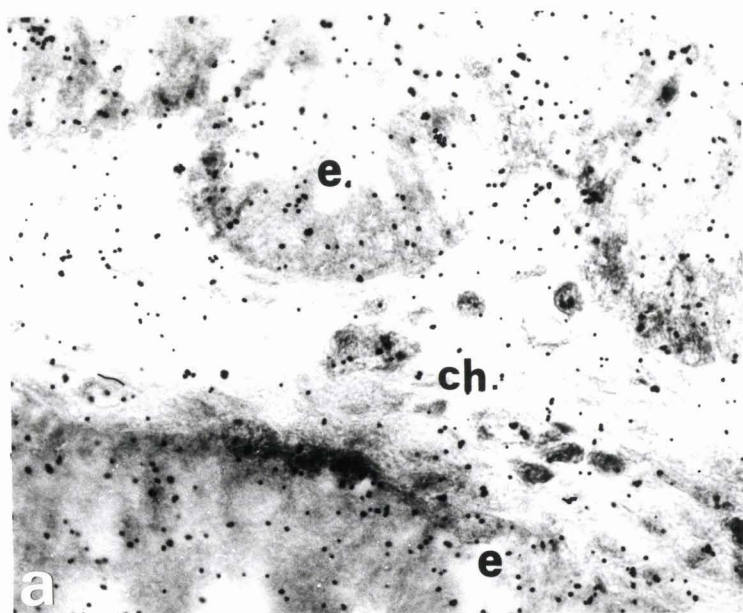
a : temps d'exposition : 60 jours ; (G. X 560)

b : temps d'exposition : 53 jours ; (G. X 560)

c : temps d'exposition : 101 jours ; (G. x 700)

d : temps d'exposition : 101 jours ; (G. X 560)

e et f : temps d'exposition : 101 jours ; (G. X 700)



BU  
MILE

3) Foie

Aucun marquage spécifique n'a été observé sur les cellules hépatiques, sur les capillaires sinusoides ou sur les veines centrolobulaires. A l'observation la quantité des grains d'argent est la même sur les coupes hybridées avec la sonde spécifique (Pl. XII, fig. d) ou avec la sonde non spécifique (Pl. XII, fig. e).

Planche XII

a et b : Radioautographies d'oesophage de la lapine gestante. Comparaison du marquage de l'épithélium (e) et du chorion (ch) après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$  (fig a) ou après hybridation avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide pBR 322 (fig b).

★ : lumière

c : Radioautographie du duodénum de la lapine gestante après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$ .

e : épithélium

ch : chorion

★ : lumière

d et e : Localisation de la radioactivité dans le foie de la lapine gestante après hybridation in situ avec l'ADNc  $^3\text{H}$  (fig d) ou après hybridation in situ avec l'ADN  $^3\text{H}$  du plasmide pBR 322 (fig e).

★ : lumière de la veine centrolobulaire.

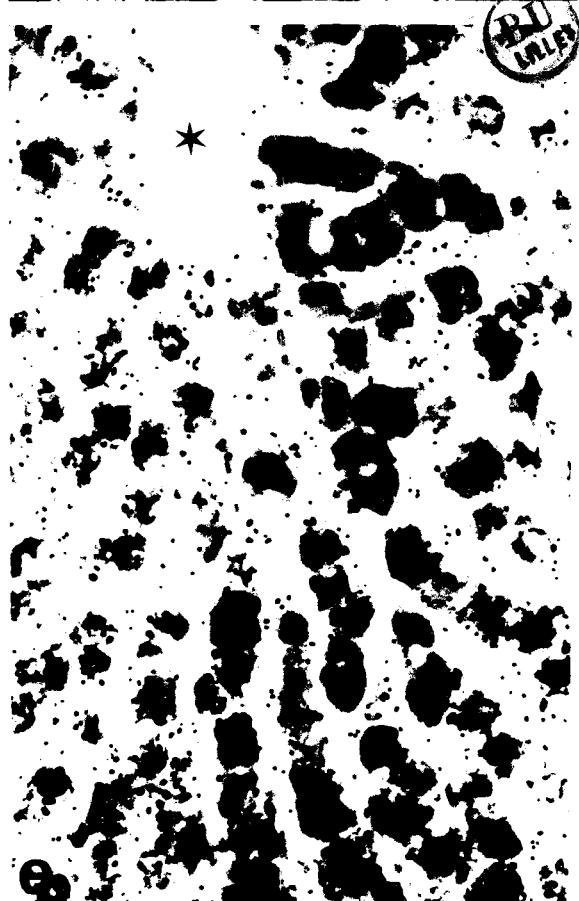
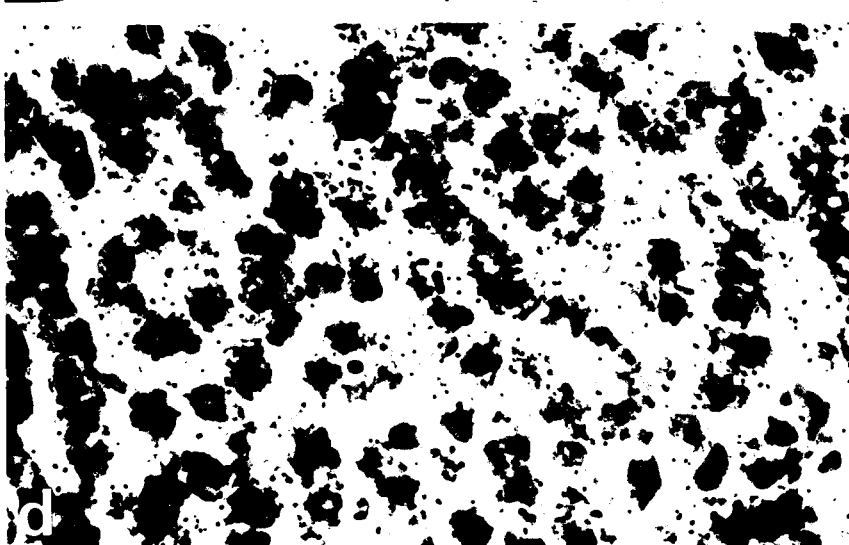
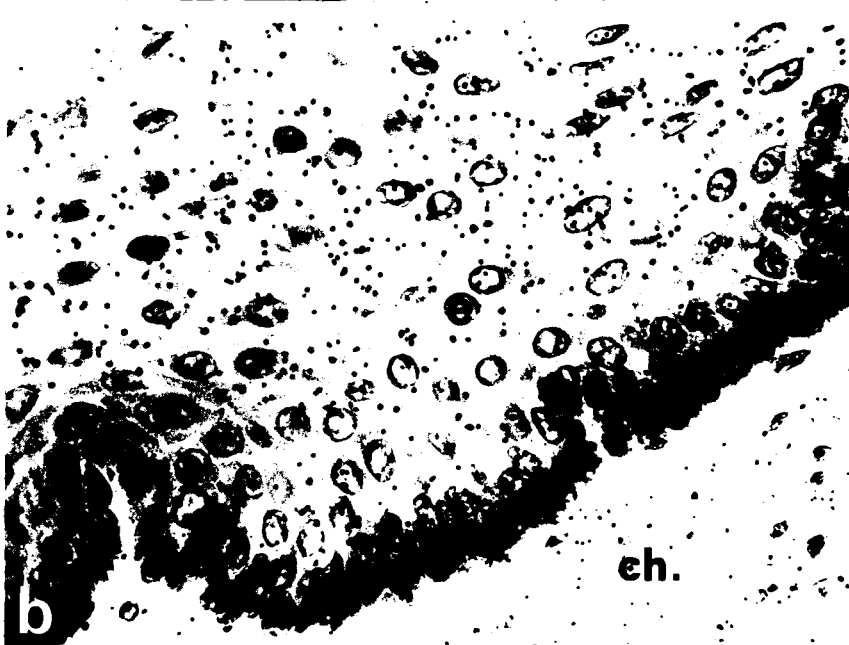
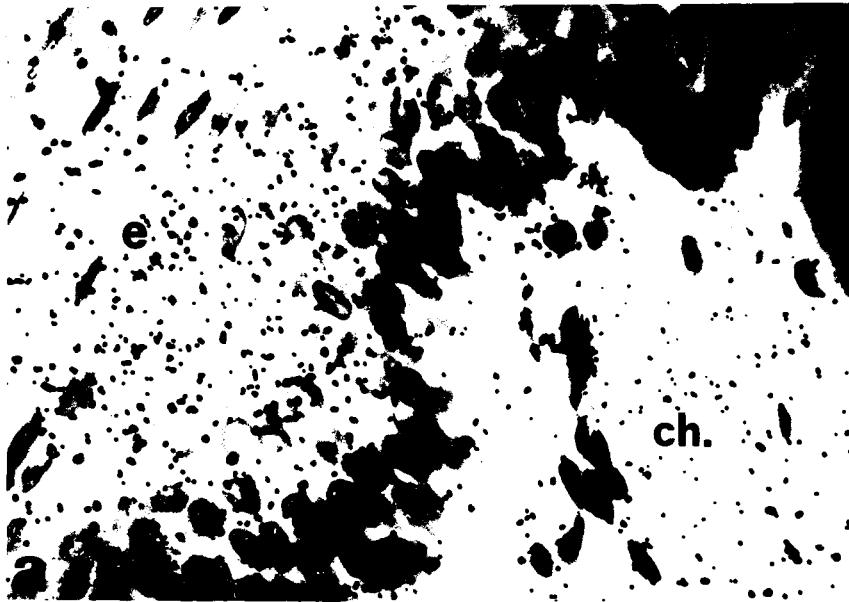
a : temps d'exposition : 101 jours ; (G. X 700)

b : temps d'exposition : 101 jours ; (G. X 560)

c : temps d'exposition : 101 jours ; (G. X 350)

d et e : temps d'exposition : 29 jours ; (G. X 560)





**DISCUSSION**

Ces résultats démontrent l'intérêt de la technique d'hybridation in situ pour détecter les lieux de synthèse de l'utéroglobine. La comparaison, entre le marquage obtenu sur les coupes hybridées avec l'ADNc <sup>3</sup>H et l'ADN <sup>3</sup>H du plasmide pBR 322, permet de vérifier la spécificité des hybrides ARNm-ADNc formés. Le marquage a été estimé comme hautement spécifique quand la moyenne des grains d'argent présents par 100 um<sup>2</sup> de tissu après hybridation avec l'ADNc <sup>3</sup>H est environ 5 fois supérieure à celle obtenue après incubation avec l'ADN <sup>3</sup>H du pBR 322.

Chez la lapine gestante de 5 jours, la corne utérine semble être le lieu privilégié de la synthèse de l'utéroglobine principalement dans les cellules épithéliales glandulaires, suivies par les cellules de l'épithélium de surface. Dans les cellules épithéliales glandulaires, les ARNm de l'utéroglobine sont situés dans l'ensemble du cytoplasme avec toutefois une concentration plus importante de grains d'argent dans la partie apicale de certaines d'entre elles. Dans le myomètre, la concentration de la radioactivité est plus importante sur le muscle circulaire interne que sur le muscle longitudinal externe. Bien que situés dans le cytoplasme des fibres, les grains d'argent sont répartis uniformément quelle que soit la région du muscle circulaire interne. De plus, le rapport obtenu entre les moyennes de grains d'argent par 100 um<sup>2</sup> après hybridation avec l'ADNc <sup>3</sup>H et après incubation avec la sonde contrôle est faible. Cette moyenne peu importante en comparaison des épithéliums de surface et glandulaire ne plaide pas en faveur d'un marquage spécifique dans le myomètre. Chez la lapine non gestante, seules quelques cellules épithéliales glandulaires et de surface présentent une image de marquage spécifique. Chez la lapine prépubère, aucun lieu de synthèse de l'utéroglobine n'a été mis en évidence.

La réaction est très nettement positive sur l'épithélium des bronches et des bronchioles aussi bien chez la lapine gestante de 5 jours que chez la lapine non gestante. Chez la lapine prépubère traitée à l'oestradiol, l'intensité du marquage dans les bronches et bronchioles est un peu plus faible mais reste cependant notable. Dans tous les cas, la radioactivité présente dans le poumon est moins importante que celle détectée dans les épithéliums de surface et glandulaire de la corne utérine.

En ce qui concerne la trompe et l'endocol, seulement quelques grains d'argent apparaissent sur les épithéliums, tandis que de nombreux grains d'argent sont visualisés sur nos coupes de vessie, de duodénum et de colon.

Cependant la différence de marquage observée entre les coupes hybridées avec l'ADNc <sup>3</sup>H et les coupes contrôles est faible pour conclure à la présence d'ARNm de l'utéroglobine. Quant à la radioactivité détectée dans l'épithélium stratifié de l'oesophage, elle semblerait indiquer la présence d'ARNm de l'utéroglobine.

Une comparaison peut être faite entre nos résultats et ceux obtenus par des techniques immunohistochimiques. Par immunofluorescence, l'utéroglobine a été détectée dans l'utérus de la lapine (Beier, 1966, 1967a et b ; Krishnan et Daniel, 1967) principalement dans les épithéliums de surface et glandulaire pendant l'oestrus et entre le 1er et le 5ème jour de gestation (Johnson, 1972 ; Kirchner, 1972, 1976a et b). Au cours de cette dernière période, la fluorescence s'étend progressivement à toutes les cellules épithéliales de l'endomètre et apparaît principalement dans les parties apicales et périnucléaires des cellules. Kirchner (1976a) distingue dans l'épithélium de l'endomètre trois types cellulaires en fonction de l'intensité et de la localisation de l'utéroglobine : le type I où cette protéine est trouvée en très petite quantité dans la cellule et plus particulièrement dans la partie apicale ; le type II où la moitié de la partie apicale des cellules contient de l'utéroglobine et le type III où l'ensemble du cytoplasme est chargé d'utéroglobine. Cet auteur précise que pendant l'oestrus, l'épithélium contient des cellules de type I et II ; qu'au 3ème jour de la gestation quasiment toutes les cellules épithéliales de l'endomètre contiennent de l'utéroglobine (type II, type III) et qu'au 5ème jour de la gestation les cellules de type III caractérisent les glandes. Lors de cette dernière période, des cellules non immunoréactives s'intercalent entre les cellules fluorescentes dans l'épithélium de surface. Les résultats obtenus par hybridation in situ montrent que la plupart des cellules contiennent des ARNm de l'utéroglobine. Aussi, soit les ARNm de l'utéroglobine ne sont pas traduits dans quelques cellules, soit, et cela semblerait plus vraisemblable, la rétention intra-cellulaire de la protéine varie. Les cellules pourraient manifester un cycle de sécrétion. Kirchner, (1979), suggère d'une part que les cellules endométriales pourraient être spécialisées en sécrétant, soit de l'utéroglobine, soit d'autres protéines spécifiques et, d'autre part que deux des types cellulaires sécrèteraient l'utéroglobine tandis que le troisième capterait la protéine dans le liquide utérin. L'hybridation in situ ne corrobore pas ces hypothèses. Les ARNm de l'utéroglobine sont distribués dans l'ensemble du cytoplasme et dans tous les cas la localisation de l'utéroglobine dans les cellules épithéliales semble liée à celle de ses ARNm. Le taux élevé d'ARNm de l'utéroglobine détecté par

hybridation in situ dans l'endomètre pendant le début de gestation est comparable à l'augmentation d'un facteur dix évaluée lors de la traduction des ARNm in vitro (Bullock et coll., 1976).

Dans la partie de la trompe la plus proche de l'utérus, Kirchner, (1976a), a également localisé l'utéroglobine dans les cellules sécrétrices de l'épithélium entre le 1er et le 3ème jour de la gestation, alors qu'au 6ème jour de la gestation le marquage disparaît. Sur nos coupes de trompe chez la lapine gestante de 5 jours, nous n'avons pas détecté d'ARNm de l'utéroglobine. Il faut cependant noter que nous avons étudié la partie de la trompe proche de l'ovaire.

La localisation des ARNm de l'utéroglobine dans les épithéliums des bronches et des bronchioles du poumon et dans les alvéoles est similaire à celle de l'utéroglobine observée par immunohistochimie (Noske et Feigelson, 1976 ; Noske et Gooding, 1978 ; Beier et coll., 1978 ; El Etreby et coll., 1983). Cependant, cette dernière technique révèle un marquage plus intense dans les bronchioles que dans les bronches principales (Beier et coll., 1978 ; El Etreby et coll., 1983). Cette différence n'apparaît pas dans nos hybridation in situ ni après observations de ces structures, ni après comptage des grains d'argent.

La technique d'hybridation in situ qui permet la localisation d'une séquence d'un acide nucléique spécifique au niveau cellulaire dans un tissu a été décrite pour la première fois en 1969 par Gall et Pardue. Employée à cette époque pour réunir deux brins d'ADN monocaténaire, elle est appliquée depuis quelques années à la détection d'ARN messager (Brahic et Haase, 1978 ; Hudson et coll., 1981 ; Hafen et coll., 1983 ; Cox et coll., 1984). Dès 1981, lors de la mise au point de la technique d'hybridation in situ pour localiser les ARNm de l'utéroglobine, nous avons accordé une attention particulière au choix du fixateur, à la composition des milieux d'hybridation et des lavages ainsi qu'aux temps des différentes étapes de la technique afin d'obtenir une hybridation ARNm-ADNc spécifique maximale, un bruit de fond minimal et une bonne conservation des ARNm et des tissus (D.E.A. Tranchant, 1982). La solution de "Denhardt" que nous avons incorporée dans notre milieu d'hybridation évite à l'ADNc <sup>3</sup>H de se fixer sur le verre. Comme le préconisait Brahic et Haase, (1978), l'addition d'ARN de transfert et d'ADN monocaténaire dans le milieu d'hybridation a éliminé les liaisons de l'ADNc <sup>3</sup>H avec les ARN ribosomiaux et de transfert. L'utilisation de nucléase S<sub>1</sub> qui permet d'éliminer les séquences

d'ADN  $^3\text{H}$  incorrectement hybridées, a amélioré l'image radioautographique au niveau des structures pulmonaires. Cette constatation n'est pas en accord avec l'hypothèse de Godart, (1983), selon laquelle un excès de nucléase  $S_1$  favoriserait l'hydrolyse de composants cellulaires qui se traduirait par l'apparition artefactuelle de grains d'argent.

Les résultats concernant les essais de détection des ARNm de l'utéroglobine dans la vessie et l'appareil digestif ont été difficile à interpréter malgré l'emploi de nucléase  $S_1$  et n'ont pas permis de conclure à la présence d'ARNm de l'utéroglobine. Plusieurs causes peuvent être envisagées pour expliquer cette difficulté à discerner un marquage spécifique. La quantité d'ARNm est insuffisante dans ces organes pour être détectée et les limites de la technique sont atteintes. Des protéines cytoplasmiques peuvent interagir avec l'ADNc  $^3\text{H}$ . Afin d'éviter cette interaction Hafen et coll., (1983), préconisent la protéinase K qui rend plus accessible les ARNm spécifiques à une association avec l'ADNc. Les quelques coupes que nous avons soumises à un traitement par cette enzyme avant l'hybridation ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants. Il est également possible d'envisager l'absence de synthèse de l'utéroglobine bien que des traces de cette protéine aient été décelées par immunoélectrophorèse (Noske et Feigelson, 1976 ; Noske et Gooding, 1978).

La régulation hormonale de la sécrétion d'utéroglobine diffère dans l'utérus et le poumon chez la lapine. L'action de la progestérone sur la production d'utéroglobine dans des cellules épithéliales utérines en culture dépend de la dose administrée : des doses faibles ( $10^{-10}\text{M}$ ) ont un effet inhibiteur tandis que des doses plus fortes ( $10^{-8}\text{M}$ ) ont un effet stimulant (Rajkumar et coll., 1983a et b). Dans l'endomètre l'administration de progestérone pendant 6 jours chez une lapine prépubère provoque une augmentation plus prononcée de la synthèse d'utéroglobine que de celle de ses ARNm (Loosfelt et coll., 1981). Dans le poumon, l'utéroglobine n'est pas induite par la progestérone bien que la présence du récepteur de la progestérone ait été signalée dans ce tissu (Savouret et coll., 1980). La sécrétion d'utéroglobine peut cependant être augmentée d'un facteur trois par un glucocorticoïde de synthèse, la dexaméthasone, sans que le niveau intracellulaire de ses ARNm ne soit modifié (Torkkeli et coll., 1978 ; Savouret et coll., 1980). Par contre, dans des cellules pulmonaires en culture traitées au cortisol pendant 24 heures, à la fois la quantité d'utéroglobine et celle de ses ARNm augmentent (Fernandez-Renau et coll., 1984). L'existence de récepteurs

des glucocorticoïdes a été montrée, par radioautographie dans le poumon chez la souris (Beer, 1983) et chez le foetus humain (Beer, 1984). Une similitude de la composition moléculaire en acides aminés de l'utéroglobine est trouvée dans l'utérus et le poumon (Torkkeli et coll., 1978 ; Glitz, 1981). Il a d'ailleurs été suggéré que l'utéroglobine n'est pas seulement une sécrétion utérine, mais une sécrétion des épithéliums en général et le nom d'utéroglobine n'apparaît pas être le plus approprié (Beato et coll., 1983). Cependant l'utéroglobine a une fonction spécifique dans l'utérus et plus vraisemblablement au moment de l'implantation du blastocyste. La signification physiologique de la présence de l'utéroglobine dans le poumon n'est pas connue.

En conclusion, les résultats obtenus dans l'endomètre et le poumon, illustrent l'intérêt de l'hybridation in situ pour localiser les cellules contenant les ARNm de l'utéroglobine. Cette technique qui précise les lieux de synthèse d'une protéine présente un avantage sur l'immunohistochimie qui, elle, permet d'évaluer la rétention intracellulaire de la protéine. Cette localisation des ARNm apporte la démonstration de l'expression du gène de l'utéroglobine dans certaines cellules et contribue à l'étude de sa régulation qui fournit un modèle intéressant pour la compréhension des mécanismes moléculaires de l'action de la progestérone chez les mammifères.

**CHAPITRE II**

DETECTION DES  
RECEPTEURS DE LA PROGESTERONE  
DANS DIFFERENTS ORGANES  
CHEZ LA LAPINE  
PAR LA TECHNIQUE RADIOAUTOGRAPHIQUE



**INTRODUCTION**

Les hormones stéroïdes induisent dans les tissus cibles la synthèse de protéines spécifiques en modifiant le taux de transcription de certains gènes (O'Malley et coll., 1976). Le mécanisme d'action des stéroïdes dans ces tissus implique une interaction spécifique entre le récepteur et la chromatine. Ce deuxième chapitre est consacré à la localisation par la technique radioautographique des protéines réceptrices spécifiques de la progestérone dans différents organes chez la lapine prépubère traitée à l'oestradiol.

Les effets physiologiques de la progestérone au niveau de l'endomètre sont connus depuis longtemps. Elle prépare l'implantation de l'oeuf et exerce un rôle dans le maintien de la gestation. La progestérone intervient dans la régulation de la concentration d'utéroglobine et de ses ARN messagers dans certains tissus (chapitre I). Il nous a semblé intéressant de détecter si certaines cellules riches en ARN messenger de l'utéroglobine précédemment décrite, pouvaient correspondre aux cellules cibles de la progestérone.

Après Jensen et Jacobson, qui en 1962 montrent l'accumulation et la rétention préférentielle d'oestradiol dans l'utérus, l'existence des récepteurs des hormones stéroïdes fut ensuite démontrée pour la progestérone (Milgrom et coll., 1970) puis pour d'autres stéroïdes. Leurs caractéristiques biochimiques furent progressivement établies ainsi que leur nature protéique. La présence de récepteurs de la progestérone a été mise en évidence dans l'utérus de nombreux mammifères : chez le rat (Milgrom et Baulieu, 1970 ; Feil et coll., 1972 ; Mc Guire et Bariso, 1972 ; Philibert et Raynaud, 1973), chez le cobaye (Falk et Bardin, 1970 ; Milgrom et coll., 1970 ; Corvol et coll., 1972 ; Feil et Bardin, 1975), chez le hamster (Leavitt et Blaha, 1972), chez la souris (Feil et coll., 1972 ; Philibert et Raynaud, 1973), chez la lapine (Mc Guire et Bariso, 1972 ; Rao et coll., 1973 ; Faber et coll., 1972 ; Philibert et Raynaud, 1974a) et chez la femme (Young et Clearly, 1974).

Les propriétés physicochimiques des récepteurs de la progestérone retrouvés dans la fraction soluble d'homogénats cellulaires (cytosol) ont été largement étudiés. On a montré qu'il existait plusieurs formes moléculaires pour un même récepteur cytosoluble par des techniques d'ultracentrifugation en gradient de densité. En fonction des conditions expérimentales, les coefficients de sédimentation des récepteurs de la progestérone varient de 10 à 3 S (unité Svedberg). Selon l'état hormonal, le récepteur de la progestérone chez le cobaye peut se présenter sous la forme 6-7 S ou sous la forme 4-5 S ; la signification physiologique de ces deux formes n'est pas connue (Milgrom et

coll., 1972).

Ces dernières années, la purification et les propriétés antigéniques du récepteur de la progestérone de la lapine ont fait l'objet de nombreuses études (Logeat, 1984) et ont permis de préparer des anticorps anti-récepteurs de la progestérone (Logeat et coll., 1983).

Les propriétés des récepteurs sont modifiées sous l'influence de l'hormone qu'ils lient. En absence d'hormone endogène, les récepteurs sont principalement retrouvés dans le cytosol tandis que après injection de l'hormone un pourcentage élevé des complexes récepteur-hormone sont liés aux noyaux (Atger et Milgrom, 1978). La translocation des récepteurs des hormones stéroïdes du cytoplasme vers les noyaux était un modèle généralement admis pour tous les récepteurs des stéroïdes (Gorski et coll., 1968 ; Jensen et coll., 1968 ; O'Malley et Means, 1974). Des travaux récents ((Welshons et coll., 1984 ; King et Creene, 1984 ; Perrot-Appianat et coll., 1985 ; Jordan et coll., 1985) remettent ce modèle en cause. Quelle que soit la localisation initiale des récepteurs (cytoplasmique ou nucléaire) la liaison de l'hormone au récepteur modifie la structure de ce dernier, ce qui entraîne l'apparition d'une affinité accrue des complexes récepteur-hormone pour la chromatine. De ce processus, appelé activation, va résulter une modification de la transcription d'un nombre restreint de gènes.

Contrairement aux techniques biochimiques qui ne tiennent pas compte de l'hétérogénéité cellulaire des tissus, les études radioautographiques permettent de localiser les différents types cellulaires contenant les récepteurs de la progestérone. La topographie des cellules cibles fixant les progestagènes, qui jusqu'à présent n'avait jamais été réalisée chez la lapine, a été établie dans l'utérus : chez le cobaye (Warembourg et Milgrom, 1971 ; Sar et Stumpf, 1974 ; Warembourg, 1974 ; Warembourg et Milgrom, 1977 ; Tardy et Pasqualini, 1980), chez le rat (Warembourg, 1978) et chez le singe (Warembourg, 1983 ; Weaker et Sheridan, 1984). Par radioautographie, les récepteurs de la progestérone sont détectés par les grains d'argent produits par les rayonnements du R 5020 tritié sur l'émulsion photographique. Lorsque le marquage correspond à l'interaction hormone-récepteur, les grains d'argent sont principalement concentrés sur les noyaux cellulaires. Cependant la technique radioautographique doit préserver cette interaction. En effet, les stéroïdes dérivant du cholestérol, sont des substances hydrosolubles et peuvent être facilement perdus ou déplacés au cours des traitements histologiques. De même,

par leur propriété lipophile, ces hormones sont des substances diffusibles et l'utilisation de solvants (alcool, toluène) utilisés lors des inclusions des tissus dans la paraffine est exclue. De plus pour conserver intacte la liaison hormone-récepteur, il est nécessaire de maintenir constamment les tissus à basse température et en atmosphère sèche. Pour éviter ces différents problèmes, une technique radioautographique qui respecte ces conditions et qui est utilisée depuis plusieurs années dans notre laboratoire (Warembourg, 1970) nous a permis de localiser avec précision les cellules cibles de la progestérone dans divers organes chez la lapine. Les tissus prélevés sont congelés et coupés au cryostat. La congélation rapide permet de conserver en bon état les structures cellulaires et de respecter l'organisation des tissus dans les organes.

La définition des récepteurs hormonaux implique les propriétés suivantes : spécificité de la liaison hormonale, spécificité de la distribution tissulaire, haute affinité et un nombre limité de sites de liaison. Afin de pouvoir conclure en radioautographie à la présence des récepteurs, visualisés par les grains d'argent, il est important d'effectuer certaines expériences contrôles permettant d'examiner la spécificité de la liaison selon les critères précédemment cités. La spécificité tissulaire est contrôlée par l'examen en parallèle d'un organe cible et non cible chez un même animal. La spécificité hormonale de l'interaction hormone-récepteur est vérifiée lorsque cette liaison n'est pas modifiée par l'injection simultanée d'un autre stéroïde sans affinité pour le récepteur du traceur. L'affinité élevée ne peut pas se vérifier en radioautographie. La liaison est saturable et cette capacité limitée est constatée lorsque simultanément au traceur, on injecte une dose massive de la même hormone mais non radioactive. Les sites de liaisons, en nombre restreint, seront alors occupés en grande partie par l'hormone non radioactive, ce qui se traduit en radioautographie, par une distribution extra nucléaire des grains d'argent.

L'utilisation de progestérone naturelle comme ligand pose plusieurs problèmes pour l'étude radioautographique des récepteurs. Le complexe hormone-récepteur formé est instable et la progestérone présente une affinité pour la globuline plasmatique liant les corticostéroïdes ("C.B.G."). Aussi pour cette étude, nous avons utilisé un marqueur spécifique des récepteurs de la progestérone, le R 5020 (promegestone) qui a été synthétisé par Philibert et Raynaud (1973, 1974a et b). Ce composé de synthèse permet une liaison stéroïde-récepteur plus stable et son affinité pour la globuline "C.B.G." est

négligeable. De plus, au cours d'études biochimiques dans l'utérus de cobaye, il a été montré que 92 à 95% de R 5020 s'associait aux récepteurs de la progestérone et non à la protéine plasmatique "P.B.G." liant ce stéroïde (Pasqualini et Nguyen, 1980). Le R 5020 présente également l'avantage d'être peu métabolisé (Raynaud, 1977). Par contre, ce progestagène garde une affinité pour les récepteurs aux glucocorticoïdes (Raynaud, 1977). Afin d'éviter cette liaison, un glucocorticoïde de synthèse, la dexaméthasone, a été injecté avant le R 5020 afin de saturer la liaison glucocorticoïde-récepteur.

Les études radioautographiques sur les récepteurs des stéroïdes gonadiques sont le plus souvent réalisées sur des animaux adultes de faible poids, chez qui la source d'hormone endogène est éliminée par ovariectomie, cela afin de rendre les sites de liaison plus disponibles pour le traceur. Cependant, nous avons préféré envisager cette étude chez l'animal prépubère car la lapine adulte ovariectomisée (3 kg) aurait nécessité une dose très importante de R5020 <sup>3</sup>H et entraîné une expérimentation trop coûteuse. L'étude du contrôle hormonal du récepteur de la progestérone a montré chez la souris (Feil et coll., 1972), le hamster (Leavitt et coll., 1974), le cobaye (Milgrom et coll., 1973a et b), le rat (Vu Hai et coll., 1978) et la lapine (Rao et coll., 1973) que les oestrogènes augmentent la concentration du récepteur de la progestérone par un mécanisme nécessitant une synthèse d'ARN et de protéines. Dans ce but, une injection d'oestradiol a eu lieu quotidiennement pendant 6 jours chez nos animaux avant le sacrifice.

La deuxième partie de cette thèse rappelle rapidement la technique radioautographique employée et expose les résultats obtenus sur la localisation des récepteurs de la progestérone chez la lapine.

MATERIELS ET TECHNIQUES

Pour la mise en évidence des récepteurs de la progestérone, nous avons utilisé la technique radioautographique mise au point au laboratoire par M. Warembourg dès 1971 (Thèse de Doctorat d'Etat 1979).

### 1 - Hormones utilisées

La promégestone (17 $\alpha$ , 21 diméthyl-19-norpréna - 4, 9-diène-3, 2-dione) tritiée (R 5020<sup>3</sup>H) avec une activité spécifique de 87 Ci/mme et la promégestone non radioactive proviennent de la "New-England Nuclear Corporation, Boston, Massachusetts".

L'oestradiol 17  $\beta$  a été obtenu chez Roussel-Uclaf, et la dexaméthasone chez Sigma.

### 2 - Préparation du traceur radioactif

Le R 5020<sup>3</sup>H est utilisé rapidement dès sa réception au laboratoire. En solution dans l'éthanol, il est mis à sec en passant sous un courant lent et continu d'azote.

### 3 - Matériel biologique

Quatre lapines prépubères New-Zealand (Charles-Rivers-France) pesant 1 + 0,2 kg sont utilisées. Les différentes préparations sont injectées aux lapines par voie sous cutanée. Elles reçoivent quotidiennement, pendant 6 jours, une injection de 250  $\mu$ g d'oestradiol mis en suspension dans 0,5 ml d'huile de sésame. Vingt-quatre heures après la dernière injection d'oestradiol, 5 mg de dexaméthasone dans 0,3 ml d'huile de sésame sont injectés aux lapines. Vingt minutes plus tard, elles reçoivent 1 mCi (3,75  $\mu$ g) de R 5020<sup>3</sup>H mis en solution dans du sérum physiologique auquel est ajouté 10 à 20% d'éthanol.

Une expérience contrôle permettant d'examiner la capacité limitée a été effectuée.

L'animal reçoit alors simultanément à l'injection du traceur 5 mg de R 5020 non tritié.

#### 4 - Prélèvement des tissus et congélation

Trente minutes après l'injection de R 5020 tritié, les lapines sont sacrifiées et les organes suivants : cornes utérines, endocol, vagin, poumons, vessie, oesophage et duodénum, sont rapidement prélevés. Les fragments sont immédiatement congelés dans de l'isopentane refroidi par l'azote liquide. Ils sont ensuite stockés à - 70°C et débités dans les quarante huit heures.

#### 5 - Préparation des radioautographies

##### \* Préparation des lames microscopiques

Les lames sont immergées pendant plusieurs jours dans l'acide sulfochromique, rincées plusieurs fois à l'eau courante, puis à l'eau distillée. Elles sont ensuite passées à l'alcool 70°C pendant 2 à 3 minutes et séchées. Ces lames propres sont plongées dans une solution de gélatine à 0,5% contenant 5% d'alun de chrome et mises à sécher à 40°C.

##### \* Montage du film

L'émulsion pelliculable AR 10 (Kodak) délicatement décollée de son support de verre, est déposée sur les lames gélatinées selon la technique de flotaison sur l'eau (PELC, 1947). Pour la détection de substances diffusibles, il est nécessaire de recueillir l'émulsion pelliculable au contact de l'eau distillée de façon à ce que le support de gélatine soit contre la lame, l'émulsion nucléaire se trouvant vers l'extérieur. Le montage du film s'effectue en chambre noire équipée d'un éclairage inactinique (filtre rouge, wratten N° 2 Kodak).

Afin d'éviter des décharges électrostatiques, la pièce est maintenue à une température ambiante de 18°C environ et à un taux d'humidité élevée (60 à 80%). Après séchage d'environ 24 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière, les lames émulsionnées sont stockées à 4°C.

##### \* Adhèrence des coupes sur les lames émulsionnées

Les fragments sont débités en coupes de 12  $\mu$ m d'épaisseur au cryostat (W.K.F. 1150, W.K.F. Brandau, Allemagne). Ce dernier, placé en chambre noire, est équipé d'une source lumineuse inactinique adaptée. Plusieurs coupes sont déposées sur les lames émulsionnées préalablement refroidies à 0°C, ce qui permet une bonne adhérence de la coupe au film sans totale décongélation.



## 6 - Exposition des radioautographies

L'exposition des radioautographies se fait au congélateur à - 18°C dans des boîtes noires étanches contenant de l'anhydride phosphorique. La durée d'exposition est de 149 à 204 jours.

## 7 - Fixation, développement et coloration des radioautographies

Avant le développement, les lames sont placées à 4°C avant d'être amenées à température ambiante. Les coupes sont soumises alors à une fixation histologique au méthanol 5 minutes puis rincées dans de l'eau distillée 5 minutes avant d'être développées dans du D 19 b (Kodak) pendant 4 minutes à 20°C.

Après un rinçage rapide dans de l'eau distillée, les lames sont fixées dans du thiosulfate de sodium à 30%, rincées 5 minutes dans de l'eau distillée avant d'être colorées au vert de méthyle-pyronine pendant 10 minutes. Le dos de chaque lame est alors débarrassé de l'excès d'émulsion pelliculable à l'aide d'un scalpel. Elles sont ensuite deshydratées et montées selon les techniques histologiques classiques.

**RESULTATS**

Planche XIII

Localisation des récepteurs de la progestérone dans l'utérus chez la lapine prépubère traitée à l'oestradiol.

a, b et c : Radioautographies de l'endomètre de la corne utérine.

On note un marquage particulièrement intense dans les cellules du chorion (ch) à proximité de l'épithélium de surface (e) et de l'épithélium glandulaire (E). Les grains d'argent sont principalement concentrés sur le noyau cellulaire (n →).

★: lumière

d : Radioautographie de l'endomètre de la corne utérine après injection de R 5020 <sup>3</sup>H précédée d'une injection en excès de R 5020 non marqué. Les grains d'argent sont dispersés uniformément sur le chorion (ch).

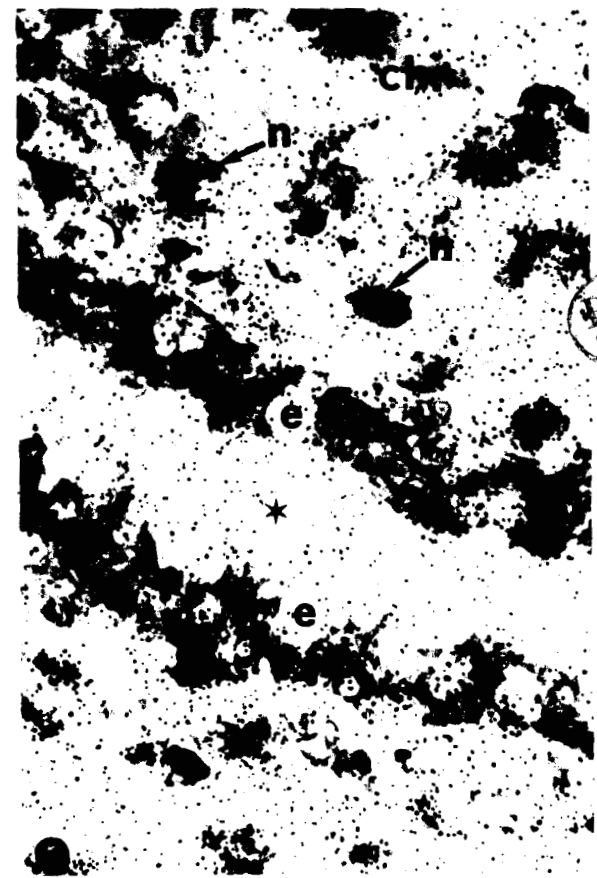
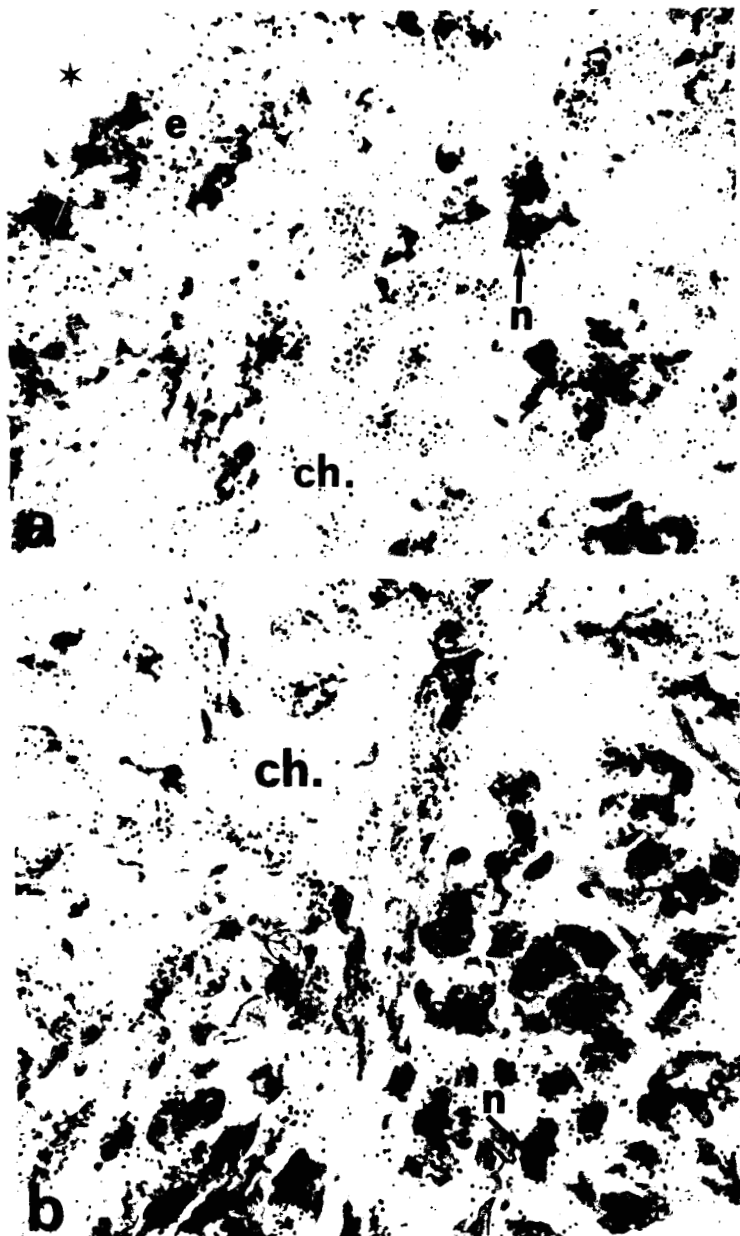
e : Radioautographie de l'endomètre de l'endocol. Les noyaux des cellules du chorion (ch) proches de l'épithélium sont fortement marqués (n →).

e : épithélium

★: lumière

a-d : temps d'exposition : 204 jours ; (G. X 560)

e : temps d'exposition : 197 jours ; (G. X 560)



BU  
1948

A - Localisation des récepteurs de la progestérone dans le tractus génital de la lapine prépubère traitée à l'oestradiol

1 - utérus (cornes utérines et endocol)

. endomètre

La présence de récepteurs de la progestérone est visualisée dans les cellules marquées par des grains d'argent qui sont principalement concentrés sur la zone nucléaire.

Dans la corne utérine, la plupart des noyaux des cellules du chorion retiennent l'hormone marquée (Pl. XIII, fig. a, b et c). Cependant des différences dans la répartition de la radioactivité dans ce tissu apparaissent. Le marquage nucléaire est particulièrement dense dans les cellules réticulaires et fusiformes du chorion proche de l'épithélium de surface (Pl. XIII, fig. a) ainsi que dans les cellules voisines de l'épithélium glandulaire (Pl. XIII, fig. c). Par contre, les cellules du chorion à proximité du myomètre montrent un marquage de plus faible intensité. Les noyaux des cellules des épithéliums de surface et glandulaire présentent peu de grains d'argent (Pl. XIII, fig. a et c). On peut cependant noter que certaines cellules épithéliales captent plus particulièrement le traceur que d'autres. Sur l'endomètre de la corne utérine après injection de R5020<sup>3</sup>H précédée d'une injection en excès de R5020 non marqué, les grains d'argent sont dispersés uniformément sans localisation spécifique sur le noyau cellulaire (Pl. XIII, fig. d).

Dans l'endocol, les marquages des cellules du chorion sont très similaires en intensité et en localisation à celui précédemment décrit dans la corne utérine (Pl. XIII, fig. e). Par contre les épithéliums de surface et glandulaire de l'endocol montrent nettement plus de cellules cibles que ceux de la corne utérine (Pl. XIII, fig. e).

. myomètre

Les fibres musculaires lisses du myomètre de la corne utérine concentrent fortement le R5020<sup>3</sup>H. Le marquage est plus dense sur les fibres musculaires circulaires internes (Pl. XIV, fig. a) que sur les fibres musculaires longitudinales externes (Pl. XIV, fig. b). Il se retrouve également sur les couches de myomètre de l'endocol, cependant comparativement à la corne utérine une plus grande concentration de grains d'argent est observée.

Ce marquage spécifique n'existe plus dans ces régions de la corne utérine (Pl. XIV, fig. d et e) et de l'endocol après injection de R5020<sup>3</sup>H précédée d'une dose massive de R5020 non radioactif.

## Planche XIV

Distribution des récepteurs de la progestérone dans la corne utérine chez la lapine.

a, b et c : Radioautographies du myomètre.

La radioactivité est concentrée sur les noyaux (n →) des fibres musculaires circulaires internes (fig a) et des fibres musculaires longitudinales externes (fig b).

Un marquage important est observé sur les noyaux (n →) des fibres musculaires de l'artère (fig c).

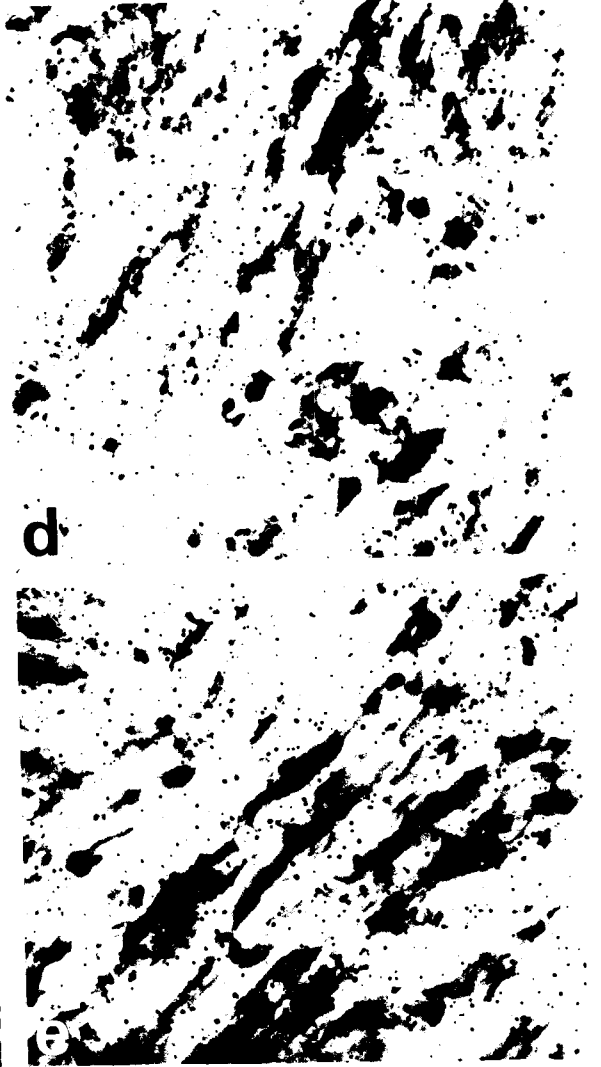
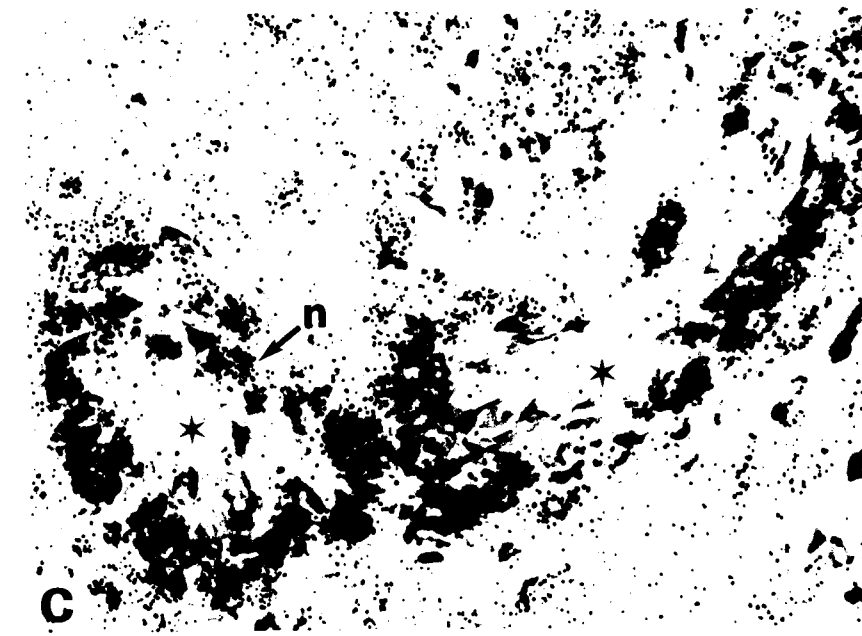
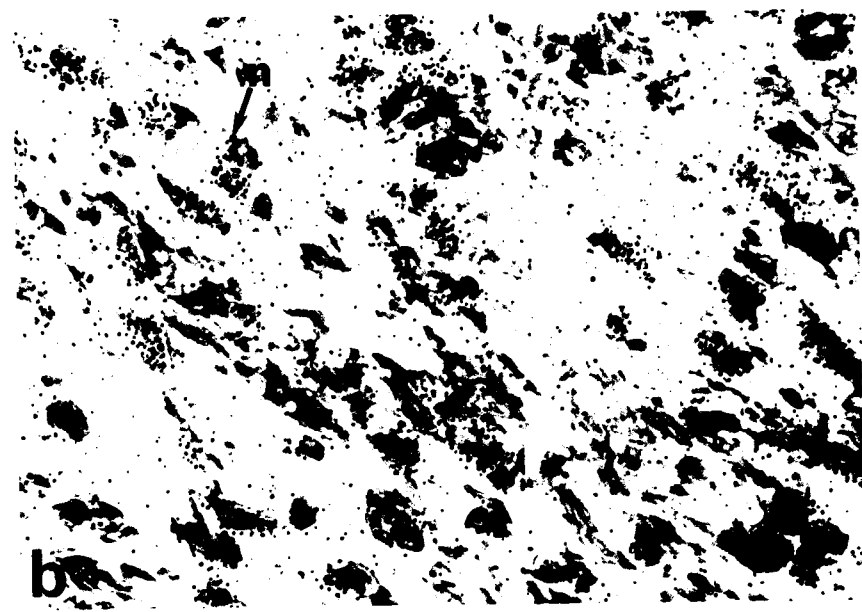
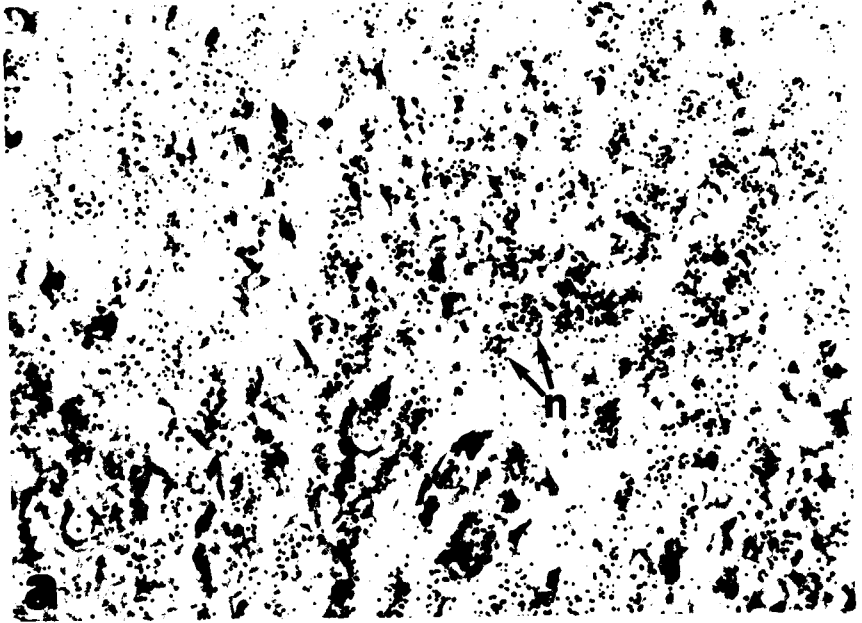
★: lumière de l'artère.

d, e et f : Radioautographies des mêmes régions du myomètre après injection de R 5020 <sup>3</sup>H précédée d'une dose massive de R 5020 non radioactif.

Aucun marquage spécifique n'est observé sur les fibres musculaires circulaires internes (fig d), sur les fibres musculaires longitudinales externes (fig e) et sur les fibres musculaires de l'artère (fig f).

a, b et c : temps d'exposition : 204 jours ; (G. X 560)

d, e et f : temps d'exposition : 194 jours ; (G. X 560)



BU  
LILL

De nombreux récepteurs de la progestérone sont présents dans la paroi des artères principalement situées dans le myomètre de l'utérus (corne utérine, endocol). On observe que la répartition des grains d'argent n'est pas identique sur les trois tuniques (interne, moyenne et externe) qui constituent cette paroi. Les récepteurs de la progestérone sont localisés sur les noyaux des fibres musculaires de la tunique moyenne ainsi appelée média (Pl. XIV, fig. c). La tunique interne formée d'un endothélium et d'une couche conjonctive sous endothéliale plus ou moins importante suivant la taille de l'artère ne présente pas de marquage de même que l'adventice conjonctivo élastique ou tunique externe (Pl. XIV, fig. c). La saturation des récepteurs de la progestérone par injection en excès d'une dose massive de R5020 non radioactif avant le R5020 tritié empêche le marquage au niveau nucléaire (Pl. XIV, fig. f).

## 2) vagin

### . muqueuse

Une accumulation spécifique de R5020 tritié ou de ses métabolites s'observe à la fois dans l'épithélium vaginal stratifié de type malpighien et dans les cellules réticulaires et fusiformes du chorion (Pl. XV, fig. a et b). La radioactivité n'est pas répartie uniformément dans les couches cellulaires de l'épithélium. Les grains d'argent sont peu nombreux sur les cellules hératinisées en bordure de la lumière vaginale. Par contre le marquage augmente fortement sur les cellules épithéliales de la couche intermédiaire puis diminue à nouveau sur les cellules de la couche basale (Pl. XV, fig. a). Dans le chorion, une concentration nucléaire plus importante de grains d'argent est présente tout particulièrement dans les cellules proches de l'épithélium (Pl. XV, fig. b). Ces dernières apparaissent à l'observation plus marquées que celles de l'utérus (corne utérine, endocol).

### . muscleuse

La muscleuse est disposée suivant deux plans peu réguliers, l'un interne composé de fibres circulaires, l'autre externe comprenant des fibres longitudinales. Entre ces deux plans, des faisceaux de fibres s'entrecroisent et donnent parfois à cette muscleuse un aspect plexiforme.

Des récepteurs de la progestérone sont présents sur les noyaux des fibres musculaires circulaires internes et des fibres musculaires longitudinales externes (Pl. XV, fig. c). Aucune différence dans l'intensité du marquage entre ces deux couches musculaires n'est observée. Dans la partie



Planche XV

Localisation des récepteurs de la progestérone dans le vagin chez la lapine.

a et b : Radioautographies de la muqueuse à des grossissements différents. Marquage nucléaire (n→) des cellules de l'épithélium (e) et plus particulièrement des cellules du chorion (ch) proches de l'épithélium.

★: lumière

c ,d et e : Radioautographies de la musculature

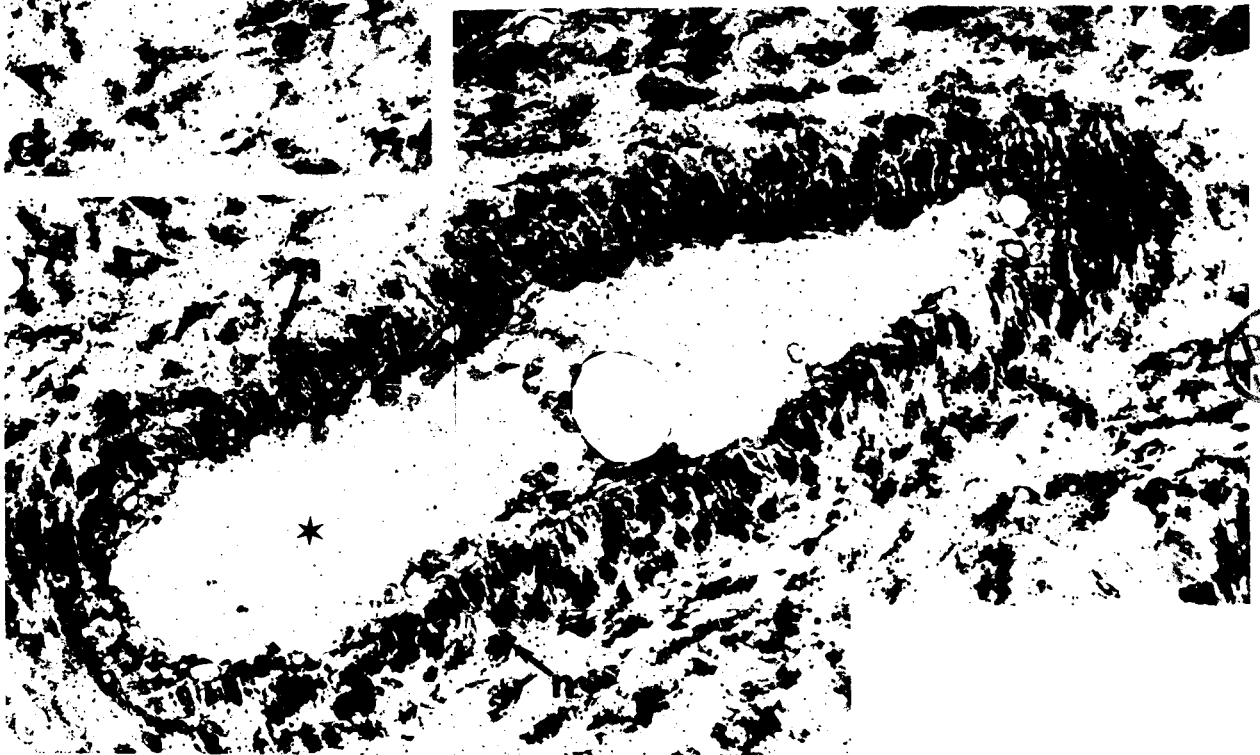
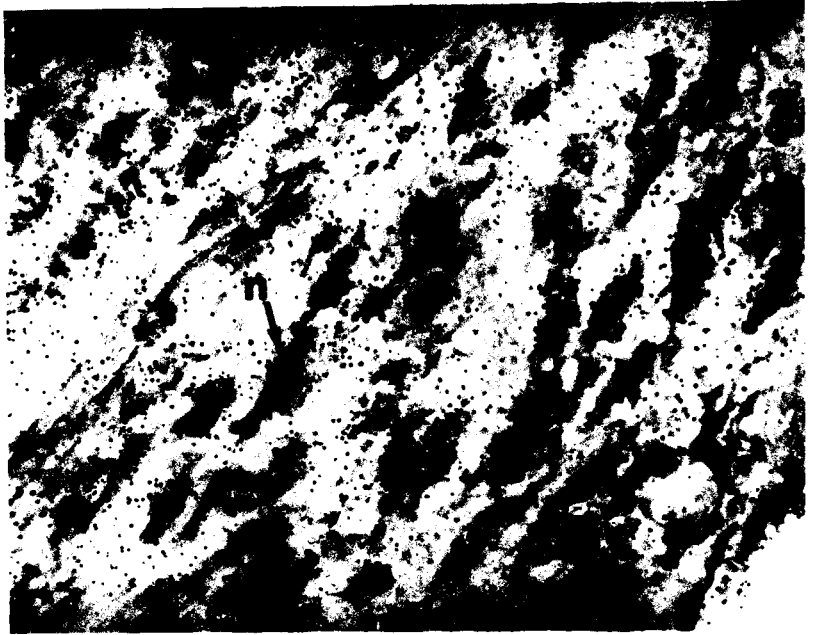
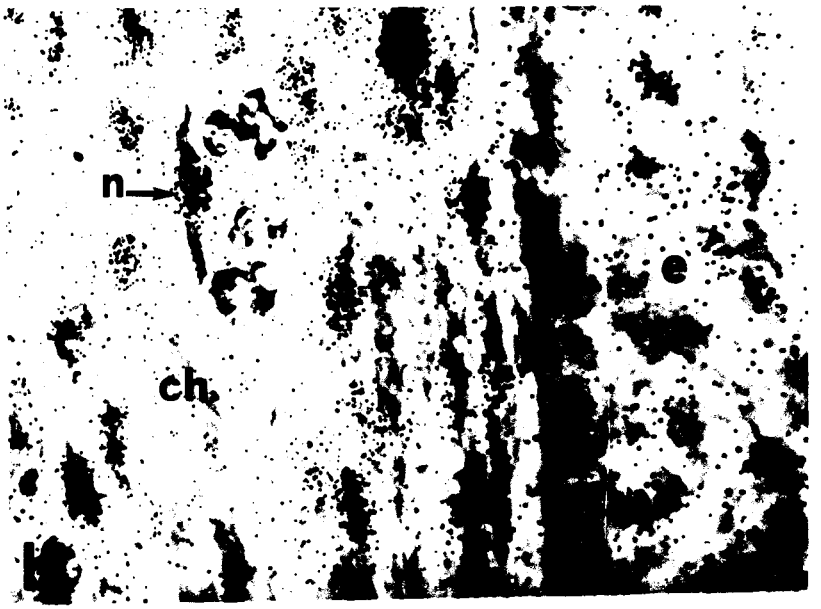
c et d : concentration de la radioactivité dans les noyaux (n→) des des fibres musculaires lisses longitudinales externes (fig c) et des fibres musculaires striées (fig d).

e : montage représentant une artère fortement marquée au niveau des noyaux des fibres musculaires (n→).

★: lumière de l'artère.

a et d : temps d'exposition : 213 jours ; (G. X 350)

b, c et e : temps d'exposition : 213 jours ; (G. X 560)



basale du vagin, viennent s'ajouter extérieurement des formations musculaires striées qui appartiennent vraisemblablement aux muscles périnéaux selon la description de Dubreuil et Canivenc (1967). Quelques noyaux de ces fibres musculaires striées sont marquées (Pl. XV, fig. d).

Comme pour l'utérus, des grains d'argent sont très abondants sur les noyaux des fibres musculaires de la tunique moyenne ou média des artères.

Sur ces tissus, les expériences de saturation des récepteurs de la progestérone provoquent une dispersion uniforme des grains d'argent.

#### B - Essais de détection des récepteurs de la progestérone dans le poumon

Une distribution importante de la radioactivité est observée sur l'épithélium pseudostratifié des bronches (Pl. XVI, fig. a) ainsi que sur l'épithélium simple des bronchioles (Pl. XVI, fig. b). Cependant dans le poumon, les grains d'argent sont essentiellement localisés sur le cytoplasme des cellules épithéliales. La rétention de radioactivité est nettement moins importante dans les autres structures des bronches : chorion, fibres musculaires lisses du muscle de Reissessen et cartilage des bronches (Pl. XVI, fig. a). De même dans les bronchioles, le chorion infiltré de fibres musculaires lisses n'est pas marqué (Pl. XVI, fig. b). Le parenchyme pulmonaire, ainsi que les fibres musculaires des artères (Pl. XVI, fig. c) qui accompagnent les bronches et bronchioles ne présentent pas d'image de marquage spécifique. Les coupes contrôles, après l'expérience de compétition, révèlent une disposition des grains d'argent similaire à celle précédemment décrite. Cette forte rétention de radioactivité ne semble donc pas résulter de l'interaction hormone-récepteur puisque le marquage n'est pas nucléaire et que la distribution topographique des grains d'argent et leur concentration ne sont pas modifiés lors de l'injection de l'hormone froide.

#### C - Détection des récepteurs de la progestérone dans la vessie

##### . muqueuse

La muqueuse est constituée d'un épithélium pavimenteux pluristratifié qui est fortement marqué. Mais il semble que ce marquage ne soit pas spécifique puisque les grains d'argent sont, comme dans le poumon, disposés à la fois sur

Planche XVI

Essais de détection des récepteurs de la progestérone dans le poumon chez la lapine.

a et b : Radioautographies de bronche et bronchiole.

a : Photomontage montrant la distribution des grains d'argent sur l'épithélium (e) d'une bronche sans localisation nucléaire spécifique.

ch : chorion

m : muscle de Reissessen

★ : lumière

b : Même observation concernant la distribution des grains d'argent pour l'épithélium (e) d'une bronchiole.

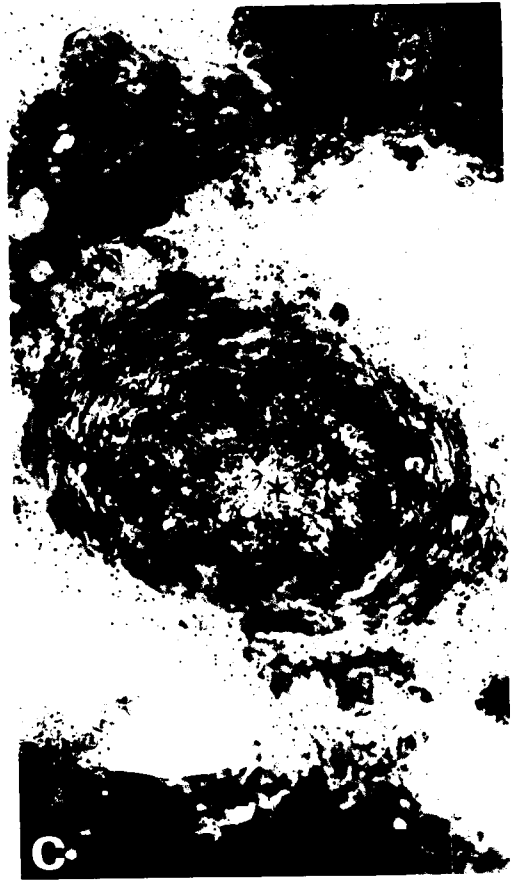
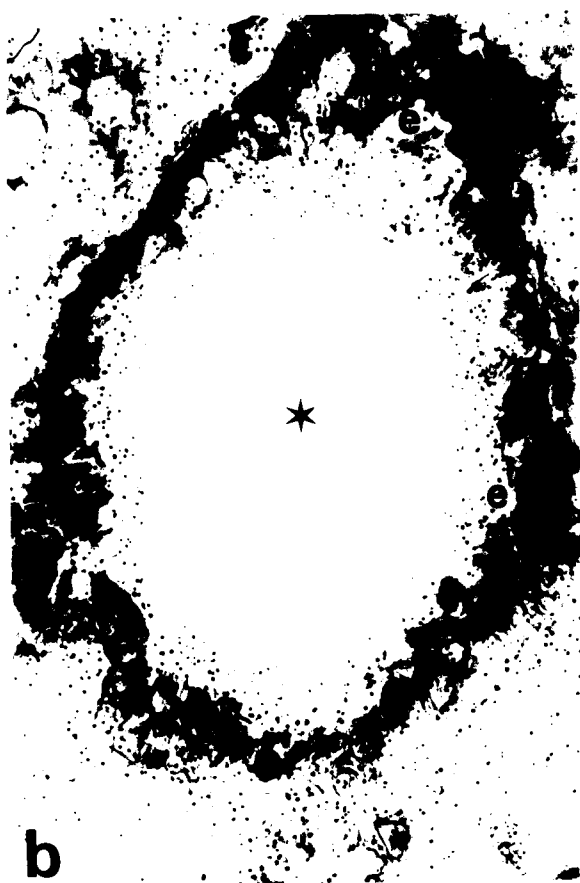
c : Radioautographie d'une artère dans le poumon ne montrant pas de marquage spécifique.

★ : lumière de l'artère.

a : temps d'exposition : 149 jours ; (G. X 560)

b : temps d'exposition : 213 jours ; (G. X 560)

c : temps d'exposition : 213 jours ; (G. X 350)



BU  
LIFE

le noyau et le cytoplasme des cellules épithéliales (Pl. XVII, fig. a). De plus, après injection du traceur précédée d'une injection en excès de R5020 non marqué, la localisation et la densité des grains d'argent sont identiques (Pl. XVII, fig. b). Par contre dans le chorion (Pl. XVII, fig. c) quelques cellules, le plus souvent situées à proximité de la musculuse, sont marquées spécifiquement.

. musculaire

La musculuse comprend schématiquement trois couches : externe avec des fibres musculaires lisses longitudinales ; moyenne avec des fibres circulaires ; interne avec des fibres longitudinales. Les fibres s'entrecroisent et se groupent parfois en faisceaux qui peuvent prendre des orientations différentes. A l'observation, il est difficile de distinguer avec précision les trois plans de la musculuse.

Après injection du R5020<sup>3</sup>H, un marquage important a été mis en évidence (Pl. XVII, fig. d, e et f). La radioactivité se concentre plus particulièrement sur les noyaux de l'ensemble des fibres musculaires lisses (Pl. XVII, fig. e et f). Des récepteurs de la progestérone peuvent également être présent dans quelques fibrocytes du tissu conjonctif entourant les faisceaux de fibres lisses. Contrairement aux artères du tractus génital (corne utérine, endocol, vagin), celles de la vessie situées dans la musculuse ne sont pas marquées.

Un excès de R5020 non radioactif injecté avant l'hormone tritié diminue fortement la concentration nucléaire de radioactivité (Pl. XVII, fig. g) des fibres musculaires ce qui nous permet de conclure à la présence de récepteurs de la progestérone dans la musculuse. Cela n'avait jamais été démontré jusqu'à présent dans ce tissu.

D - Expérience contrôle dans des organes considérés comme non cibles  
oesophage-intestin

La spécificité tissulaire de l'interaction hormone-récepteur a été vérifiée sur l'oesophage et l'intestin. Aucune accumulation spécifique de R5020<sup>3</sup>H n'a été observée dans ces organes considérés comme non cibles pour la progestérone.

Planche XVII

Localisation des récepteurs de la progestérone dans la vessie chez la lapine.

a et b : Radioautographies de la muqueuse

Comparaison du marquage sur la muqueuse après injection de R 5020  $^3\text{H}$  (fig a) et après injection du traceur précédée d'une injection en excès de R 5020 non marqué (fig b).

Les grains d'argent sont dispersés uniformément sur l'épithélium (e).  
ch : chorion.

c : Marquage nucléaire (n →) dans quelques cellules du chorion (ch)  
e : épithélium  
m : musculuse

d - g : Radioautographies de la musculuse

d : concentration de la radioactivité dans les noyaux des fibres musculaires lisses.

e et f : fort grossissement de ces fibres musculaires lisses mettant en évidence le marquage nucléaire.

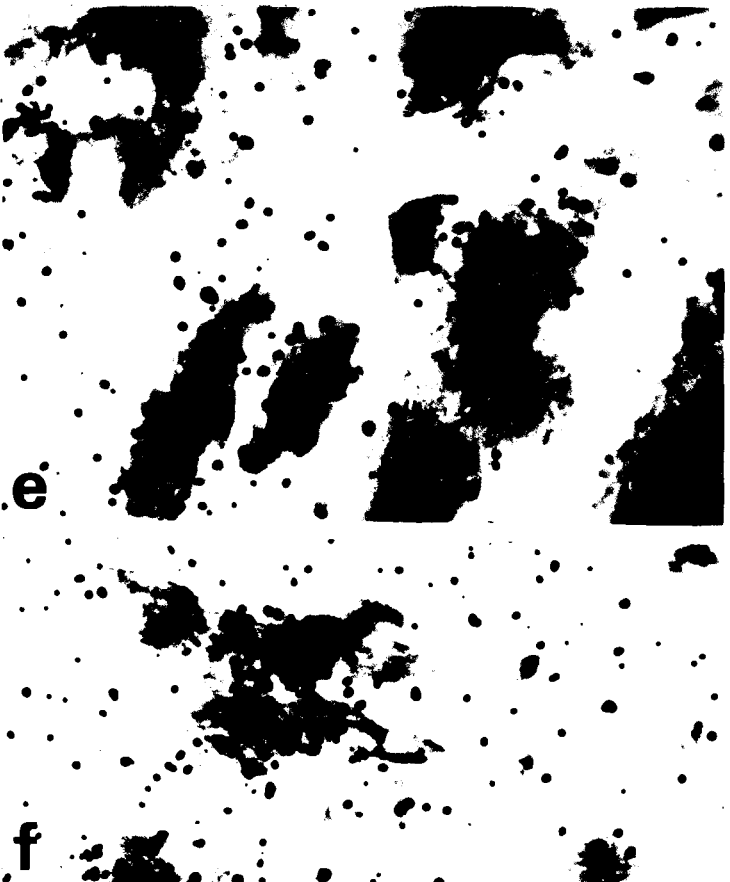
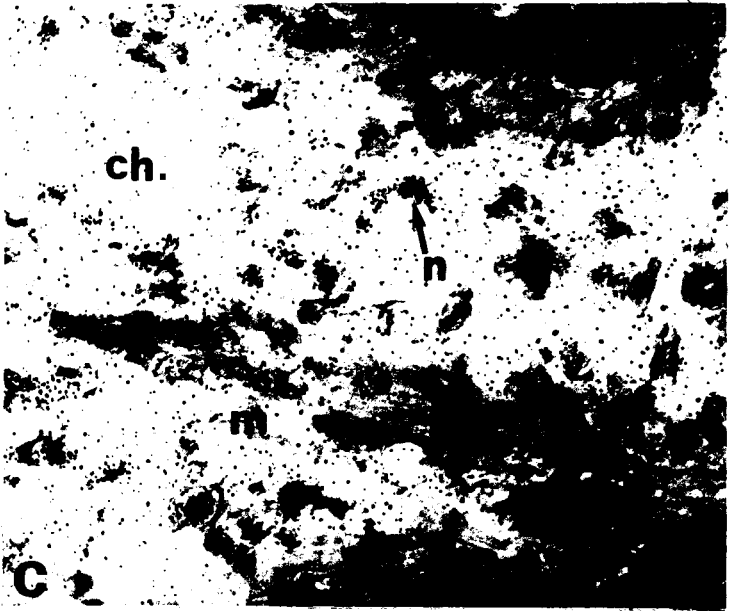
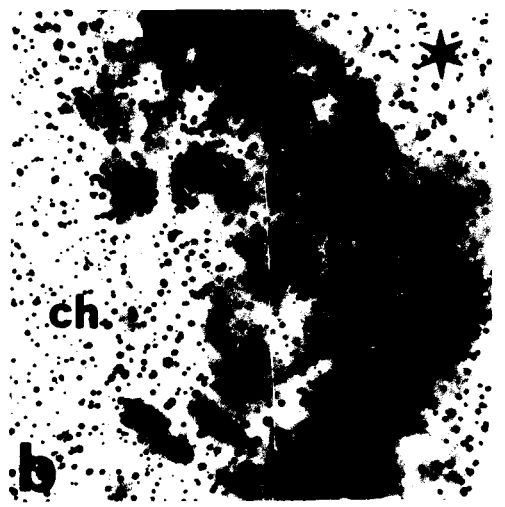
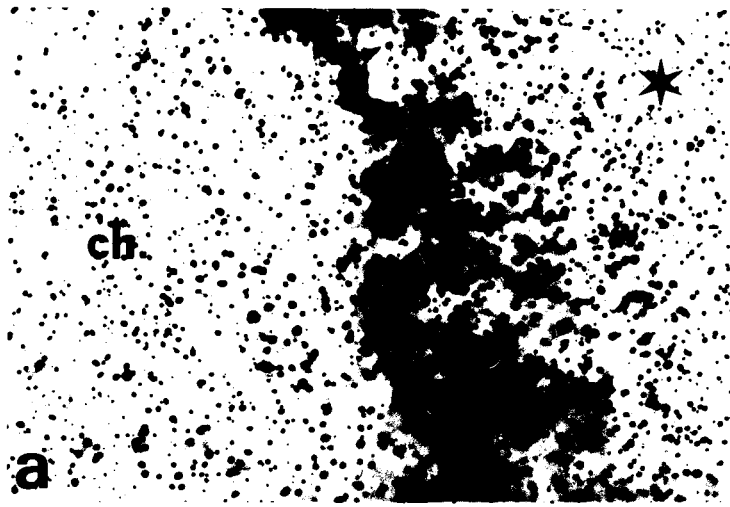
g : marquage non spécifique de la musculuse après saturation des récepteurs.

a et d : temps d'exposition : 204 jours ; (G. X 560)

b et g : temps d'exposition : 195 jours ; (G. X 560)

c : temps d'exposition : 204 jours ; (G. X 460)

e et f : temps d'exposition : 204 jours ; (G. X 1400)



BU  
FILE



**DISCUSSION**

Chez la lapine prépubère traitée à l'oestradiol, les récepteurs de la progestérone sont présents en grand nombre dans le tractus génital (corne utérine, endocol, vagin). Les grains d'argent sont principalement localisés dans la zone nucléaire des cellules marquées.

Dans la corne utérine, les épithéliums de surface et glandulaire sont peu marqués. Les cellules du chorion, à proximité des épithéliums de surface et glandulaire, renferment une quantité importante de grains d'argent. Les fibres musculaires de l'ensemble du myomètre sont également marquées.

Dans l'endocol, au niveau des épithéliums de surface et glandulaire, la concentration en radioactivité est un peu plus importante que dans la corne utérine tandis que le marquage des cellules du chorion est très similaire en intensité et en localisation. Les fibres musculaires de l'endocol montrent un marquage plus dense que celles de la corne utérine.

Dans le vagin, la radioactivité, présente sur l'épithélium stratifié, est plus importante sur les noyaux des cellules de la couche intermédiaire que sur les cellules basales. Le marquage des cellules du chorion est identique en localisation à celui précédemment décrit pour l'utérus mais les grains d'argent sont plus nombreux. La paroi musculaire lisse du vagin ainsi que quelques fibres musculaires striées du muscle périnéal sont fortement marquées.

Les vaisseaux sanguins (artères-artérioles) du myomètre de la corne utérine, de l'endocol et de la musculeuse du vagin renferment une forte concentration de grains d'argent sur les noyaux des fibres musculaires de la tunique moyenne.

Dans la vessie, le nombre important de grains d'argent dispersés à la fois sur le cytoplasme et le noyau des cellules épithéliales ne semble pas correspondre à un marquage spécifique. Par contre, des récepteurs de la progestérone sont présents dans quelques cellules du chorion, dans les fibres musculaires de la musculeuse et dans quelques fibrocytes situés dans le tissu conjonctif entourant des faisceaux de fibres musculaires.

Dans le poumon, le marquage observé sur l'épithélium des bronches et des bronchioles ne semble pas résulter de l'interaction hormone-récepteur.

Les expériences contrôles (capacité limitée et spécificité tissulaire) nous

permettent d'affirmer la présence de récepteurs de la progestérone dans certains tissus (utérus, vagin, musculature de vessie). De plus, in vitro, différents auteurs signalent que le R 5020 est peu métabolisé (Raynaud, 1977) et qu'environ 82% de la radioactivité retrouvée dans le système nerveux central correspond à du R 5020 inchangé (Kato et coll., 1978). Il semble donc que la plus grande partie du marquage observé corresponde à du R 5020 <sup>3</sup>H et non à des métabolites.

Dans ce travail, des récepteurs de la progestérone sont détectés pour la première fois dans les fibres musculaires des vaisseaux sanguins dans le tractus génital. On sait que la progestérone prépare la nidation utérine de l'oeuf en modifiant l'endomètre au cours du cycle oestrien. Les récepteurs de la progestérone dans les vaisseaux sanguins pourraient jouer un rôle dans l'augmentation de la vascularisation qui se produit chez tous les mammifères. En 1984, Sheridan et Mc Gill avaient déjà localisé par radioautographie des récepteurs de la progestérone, qui ne seraient pas sous la dépendance des oestrogènes, dans les fibres musculaires de la média de l'aorte et des artères coronaires chez le singe. Pour cette dernière étude, un autre composé de synthèse (ORG 2058) qui a, chez le rat, une affinité pour les récepteurs de la progestérone équivalente au R 5020, (Quick et coll., 1982) avait été utilisé.

Nous avons observé l'existence de récepteurs de la progestérone dans la musculature de la vessie. Jusqu'à présent, cela n'a jamais été démontré chez d'autres mammifères. Punnonen et coll., (1983) après avoir constaté chez la femme que les oestrogènes avaient un effet thérapeutique bénéfique sur certains problèmes urinaires comme l'incontinence pendant la grossesse, la post-ménopause ou la phase folliculaire, suggèrent que les stéroïdes gonadiques pourraient inhiber ces troubles. Cependant ces auteurs n'ont pas détecté de récepteurs, ni de la progestérone, ni de l'oestradiol, dans la fraction cytosolique de la vessie. Après injection d'oestradiol chez la lapine, Batra et coll., (1985) montrent une forte augmentation du flux sanguin dans l'utérus, le vagin et l'urètre, tandis que le traitement oestradiol-progestérone combiné a peu d'effet. La progestérone semble donc inhiber l'action des oestrogènes. Par contre dans la vessie, l'oestradiol ne cause aucun changement du flux sanguin. D'après ces auteurs, les stéroïdes gonadiques ont des implications pathophysiologiques importantes sur l'incontinence urinaire. La présence de récepteurs de la progestérone dans la paroi des vaisseaux sanguins de l'utérus et du vagin pourraient avoir une influence sur la régulation du flux sanguin observé par Batra et coll. (1985).

Nos observations radioautographiques permettent d'apporter plus de précision à certains résultats obtenus par les techniques biochimiques. Chilton et coll., (1982) étudiant la distribution des récepteurs de la progestérone dans les fractions cytosolique et nucléaire de différents tissus de l'utérus chez la lapine trouvent que 64,3% des récepteurs se situent dans le complexe épithélium-chorion, 11% dans le chorion et 24,7% dans le myomètre. En fait, les cellules épithéliales étant peu marquées, cette valeur de 64,3% doit correspondre en majorité aux cellules fortement marquées du chorion que nous avons observées à proximité des épithéliums de surface et glandulaire.

Certains de nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par radioautographie dans le tractus génital chez le cobaye (Warembourg, 1971, 1974 ; Sar et Stumpf, 1974 ; Warembourg, 1977 ; Tardy et Pasqualini, 1980), chez le rat (Warembourg, 1978) et chez le singe (Warembourg, 1983 ; Weaker et Sheridan, 1984) qui montrent une concentration importante de récepteurs de la progestérone dans les noyaux des cellules du chorion et dans les fibres du myomètre. De même, des cellules cibles sont détectées dans l'épithélium du vagin chez le cobaye (Sar et Stumpf, 1974 ; Warembourg, 1977), chez le rat (Warembourg, 1978) et chez le singe (Warembourg, 1983 ; Weaker et Sheridan, 1984). Pour tous ces auteurs, l'intensité du marquage dans l'épithélium stratifié du vagin des mammifères précédemment cités, diminue de la couche basale vers la lumière. Contrairement à cette observations nous trouvons, chez la lapine, une plus grande concentration de radioactivité dans les noyaux des cellules épithéliales de la couche intermédiaire et non basale. Des différences existent également dans la distribution des grains d'argent dans le myomètre. Chez la lapine, la majorité des récepteurs de la progestérone est observée dans le muscle circulaire interne tandis que chez le cobaye, le rat et le singe, le muscle longitudinal externe est plus fortement marqué que le muscle circulaire interne. Ces variations dans la quantité de récepteurs de la progestérone dans le myomètre et dans leur localisation dans le vagin pourraient être dues à des différences entre espèces.

Récemment, Perrot-Applanat et coll., (1985, 1986) ont étudié la localisation immunocytochimique du récepteur de la progestérone dans l'utérus de la lapine prépubère traitée à l'oestradiol. Les types cellulaires immunoréactifs sont les mêmes que ceux que nous décrivons par radioautographie. Une réaction plus intense est également obtenue dans les cellules du chorion, suivie par les fibres du myomètre tandis que les cellules épithéliales montrent une coloration immunocytologique beaucoup plus faible et hétérogène. Le marquage nucléaire décrit par Perrot-Applanat et coll. (1985, 1986) en

immunohistochimie suggère bien, comme l'indique Jordan et coll. (1985) que la translocation du complexe récepteur-hormone du cytoplasme au noyau pourrait résulter d'un artefact.

Il semble que le poumon soit un organe cible pour la progestérone d'après les études biochimiques de Bakhle et Ben-Harari (1979a et b) effectuées sur le cytosol pulmonaire. Savouret et coll., (1980) détectent également dans le poumon de lapine une macromolécule ayant les caractéristiques des récepteurs de la progestérone. Par contre, des cellules cibles de la progestérone n'ont jamais été localisées par radioautographie dans cet organe. La distribution importante des grains d'argent que nous avons observée sur le cytoplasme des cellules épithéliales des bronches et des bronchioles pourrait être due à la présence de protéines de liaison du R 5020. Connaissant la localisation de l'utéroglobine et de ses ARN messagers dans l'épithélium des bronches et des bronchioles chez la lapine et étant donné sa capacité à lier la progestérone (Beato et coll., 1983), il nous est permis de suggérer que l'utéroglobine puisse se lier au R 5020.

En conclusion, les résultats présentés dans ce chapitre montrent une distribution importante des récepteurs de la progestérone dans le tractus génital et dans la musculature de la vessie. En revanche, aucun marquage spécifique n'a été observé dans le poumon et l'appareil digestif.

**CONCLUSION GENERALE**

La présence d'ARN messagers de l'utéroglobine (chapitre I) dans les épithéliums de surface et glandulaire de la corne utérine et dans les cellules épithéliales des bronches et des bronchioles dans le poumon indique que le gène de l'utéroglobine est traduit dans ces épithéliums. En revanche, il semble d'une part que la majorité des récepteurs de la progestérone ne soient pas localisés dans ces types cellulaires et d'autre part qu'ils soient inexistantes dans le poumon (chapitre II). Notons cependant que les expériences n'ont pas été faites dans les mêmes conditions physiologiques et qu'une distribution des récepteurs pourrait être différente dans les cellules épithéliales de l'utérus chez la lapine gestante. Dans le tractus génital, les cellules du chorion proches des épithéliums de surface et glandulaire et particulièrement riches en récepteurs de la progestérone peuvent jouer un rôle dans la régulation de la synthèse de l'utéroglobine.

Ce travail effectué chez la lapine a permis, d'une part de localiser par hybridation in situ, les ARN messagers de l'utéroglobine dans la corne utérine, le poumon et l'oesophage, d'autre part d'observer des récepteurs de la progestérone dans le tractus génital (corne utérine, endocol, vagin) et sa vessie. Cette étude est également la première à mettre en évidence par radioautographie des récepteurs de la progestérone dans les fibres musculaires de la média des vaisseaux sanguins du tractus génital et dans les fibres musculaires de la musculature de la vessie. Nos résultats peuvent contribuer à une meilleure connaissance de la régulation par la progestérone de la synthèse de l'utéroglobine chez la lapine.

**BIBLIOGRAPHIE**



- Allen, T.C. and Leavitt, W.W. (1981)  
Characterization and comparison of progesterone receptor in hamster vagina and uterus.  
*J. Steroid. Biochem.*, 14 : 29-36.
- Atger, M., Baulieu, E.E. and Milgrom, E. (1974)  
An investigation of progesterone receptors in guinea pig vagina, uterine cervix, mammary glands, pituitary and hypothalamus.  
*Endocrinology*, 94 : 161-167.
- Atger, M. and Milgrom, E. (1977)  
Progesterone-induced messenger RNA. Translation, purification, and preliminary characterization of uteroglobin mRNA.  
*J. Biol. Chem.*, 252 : 5412-5418.
- Atger, M. and Milgrom, E. (1978)  
Interaction of glucocorticoid-receptor complexes with rat liver nuclei.  
*Biochem. Biophys. Acta*, 539 : 41-53.
- Atger, M., Savouret, J.F. and Milgrom, E. (1980a)  
Synthesis, purification and characterization of a DNA complementary to uteroglobin messenger RNA.  
*J. Steroid Biochem.*, 13 : 1157-1162.
- Atger, M., Perricaudet, M., Tiollais, P. and Milgrom, E. (1980b)  
Bacterial cloning of the rabbit uteroglobin structural gene.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun*, 93 : 1082-1088.
- Atger, M., Atger, P., Tiollais, P. and Milgrom, E. (1981)  
Cloning of rabbit genomic fragments containing the uteroglobin gene.  
*J. Biol. Chem.*, 256 : 5970-5972.
- Bakhle, Y.S. and Ben-Harari, R.R. (1979a)  
Effects of oestrous cycle and exogenous steroids on 5-hydroxytryptamine metabolism in rat lung.  
*Journal of Physiology*, 291 : 11-18.
- Bakhle, Y.S. and Ben-Harari, R.R. (1979b)  
Effects of the oestrous cycle and exogenous ovarian steroids on metabolism of  $\beta$ -phenyl-ethylamine in rat lung.  
*British Journal of Pharmacology*, 67 : 109-114.
- Batra, S., Bjellin, L., Iosif, S., Martensson, L. and Sjörgren, C. (1985)  
Effect of oestrogen and progesterone on the blood flow in the lower urinary tract of the rabbit.  
*Acta Physiol. Scand.*, 123 : 191-194.

- Beato, M. and Baier, R. (1975)  
Binding of progesterone to the proteins of the uterine luminal fluid.  
Identification of uteroglobin as the binding protein.  
Biochim. Biophys. Acta., 392 : 346-356.
- Beato, M. (1976)  
Binding of steroids of uteroglobin.  
J. Steroid. Biochem., 7 : 327-334.
- Beato, M. (1977)  
Physico-chemical characterization of uteroglobin and its interaction with progesterone.  
Development in Mammals, II : 173-198.  
North Holland Publishing Co. Amsterdam.
- Beato, M., Arnemann, J., and Voss, H.J. (1977)  
Spectrophotometric study of progesterone binding to uteroglobin.  
J. Steroid. Biochem., 8 : 725-730.
- Beato, M., Arnemann, J., Menne, C., Müller, H., Suske, G. and Wenz, M. (1983)  
Regulation of the expression of the uteroglobin gene by ovarian hormones.  
"Regulation of Gene Expression by Hormones" (ed. K.W. McKerns) Plenum.  
Publ. Co, New York : 151-175.
- Beer, D.G., Cunha, G.R. and Malkinson, A.M. (1983)  
Autoradiographic demonstration of the specific binding and nuclear localization of <sup>3</sup>H dexamethasone in adult mouse lung.  
Lab. Invest., 49 : 725-734.
- Beer, D.G., Butley, M.S., Cunha, G.R. and Malkinson, A.M. (1984)  
Autoradiographic localization of specific (<sup>3</sup>H) dexamethasone binding in fetal lung.  
Dev. Biol., 105 : 351-364.
- Beier, H.M. (1966)  
Das protein milieu in serum, uterus and blastocysten des kaninchens vor der nidation.  
Beerman W. (ed) Biochemie der morphogenese. Konstanz : Deutsche Forschungsgemeinschaft pp 1-10.
- Beier, H.M. (1967a)  
Veränderungen an protein muster des uterus bei dessen ernährung funktion für die blastocyte des Kaninchens.  
Verh. Dtsch Zool. Ges Heidelberg 31 : 139-148.
- Beier, H.M. (1967b)  
Biochemisch-entwick lungs physiologische untersuch ungen am protein milieu für die blastocystenent-wicklung des Kaninchens (oryctolagus cuniculus).  
Diss Naturwiss Fakultät Marburg/Lahn, Marburg/Lahn.

Beier, H.M. (1968)

Uteroglobulin, a hormone sensitive endometrial protein involved in blastocyst development.

Biochim. Biophys. Acta, 160 : 289-291.

Beier, H.M. (1976)

Uteroglobulin and related biochemical changes in the reproductive tract during early pregnancy in the rabbit.

J. Reprod. Fertil. Suppl., 25 : 53-69.

Beier, H.M., Kirchner, C. and Mootz, U. (1978)

Uteroglobulin-like antigen in the pulmonary epithelium and secretion of the lung.

Cell Tissue Res., 190 : 15-25.

Beier, H.M., Mootz, U. and Fischer, B. (1980)

New aspects of the physiology of uteroglobulin.

Steroid induced uterine proteins (M. Beato, ed.) pp 47-67, Elsevier/North-Holland Biomedical press, Amsterdam.

Ben Harari, R.R., Amit, T. and Youdim, M.B.H. (1983)

Binding of oestradiol, progesterone and prolactin in rat lung.

J. Endocr., 97 : 301-310.

Boschkanl, R. and Kirchner, C. (1981)

Uteroglobulin and the accumulation of progesterone in the uterine lumen of the rabbit.

Arch. Dev. Biol., 190 : 127-131.

Bullock, D.W., Woo, S.L.C., and O'Malley, B.W. (1976)

Uteroglobulin messenger RNA : translation in vitro.

Biol. Reprod., 15 : 435-443.

Brahic, M. and Haase, A.T. (1978)

Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridization.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, 12 : 6125-6129.

Chikusu, P.M., Mc Connell, K.N. and Green, B. (1982)

Progesterone nuclear receptor levels in rat uterine myometrium during early pregnancy.

J. Steroid. Biochem., 16 : 489-492.

Chilton, B.S., Nicosia, S.V. and Lyttle, C.R. (1982)

Cytosol and nuclear estrogen and progesterone receptors in the rabbit endocervix.

J. Steroid. Biochem., 17 : 363-369.

- Corvol, P., Falk, R., Freifeld, M. and Bardin, C.W. (1972)  
In vitro studies of progesterone binding protein in guinea pig uterus.  
Endocrinology, 90 : 1464-1469.
- Cox, K.H., Deleon, D.V., Angerer, L.M. and Angerer, R.C. (1984)  
Detection of mRNA in sea urchin embryos by in situ hybridization using  
asymmetric RNA probes.  
Devel. Biol., 101 : 485-502.
- Daniel, J.C. (1964)  
Early growth of rabbit trophoblast.  
Am. Natural, 98 : 85-97.
- Daniel, J.C. and Levy, J.D. (1964)  
Action of progesterone as a cleavage inhibitor of rabbit ova in vitro.  
J. Reprod. Fertil., 7 : 323-329.
- Daniel, J.C. (1976)  
Blastokinin and analogous proteins.  
J. Reprod. Fertil. Suppl., 25 : 71-83.
- Dubreuil, G. et Canivenc, R. (1967)  
Manuel théorique et pratique d'Histologie. Tome 2 sixième édition. Editeurs  
Vigot Frères.
- El-Banna, A.A. and Daniel, J.C. (1972a)  
Stimulation of rabbits blastocysts in vitro by progesterone and uterine  
proteins in combination.  
Fertil. Steril., 23 : 101-104.
- El-Banna, A.A. and Daniel, J.C. (1972b)  
The effect of protein fractions from rabbit uterine fluids on embryo  
growth and uptake of nucleic acid and protein precursors.  
Fertil. Steril., 23 : 105-114.
- EL Etreby, M.F., Beier, H.M., Elger, W., Mahrous, A.T. and Töpert, M. (1983)  
Immunocytochemical localization of uteroglobin in the genital tract of male  
rabbits.  
Cell Tissue Res., 229 : 61-73.
- Faber, L.E., Sandmann, M.L. and Stavely, H.E. (1972)  
Progesterone binding proteins of the rat and rabbit uterus.  
J. Biol. Chem., 247 : 5648-5649.
- Falk, R.J. and Bardin, C.W. (1970)  
Uptake of tritiated progesterone by the uterus of the ovariectomized guinea  
pig.  
Endocrinology, 86 : 1059-1063.

- Feigelson, M., Noske, I.G., Goswami, A.K. and Kay, E. (1977)  
Reproductive tract fluid proteins and their hormonal control.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 289 : 273-286.
- Feil, P.D., Glasser, S.R., Toft, D.O. and O'Malley, B.W. (1972)  
Progesterone binding in the mouse and rat uterus.  
Endocrinology, 91 : 738-746.
- Feil, P.D. and Bardin, C.W. (1975)  
Cytoplasmic and nuclear progesterone receptors in the guinea pig uterus.  
Endocrinology, 97 : 1398-1407.
- Fernandez-Renau, D., Lombardero, M. and Nieto, A. (1984)  
Glucocorticoid-dependent uteroglobin synthesis and uteroglobin mRNA levels  
in rabbit lung explants cultured in vitro.  
J. Biochem., 144 : 523-527.
- Fridlansky, F. and Milgrom, E. (1976)  
Interaction of uteroglobin with progesterone, 5 $\alpha$ -pregnane-3,20-dione and  
estrogens.  
Endocrinology, 99 : 1244-1251.
- Gall, J.G. and Pardue, M.D. (1969)  
Formation and detection of RNA : DNA hybrid molecules in cytological  
preparations.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63 : 378-383.
- Glitz, H.H. (1981)  
Die hormonelle regulation des uteroglobin-ähnlichen antigens in der lunge  
des kaninchens.  
Dissertation, RWTH Aachen.
- Godard, C.M. (1983)  
Improved method for detection of cellular transcripts by in situ  
hybridization.  
Histochem., 77 : 123-131.
- Gorshi, J., Toft, D., Shyamala, G., Smith, D. and Notides A. (1968)  
Hormone receptors studies on the interaction of estrogen with the uterus.  
Recent Prog. Horm. Res., 24 : 45-80.
- Gulyas, B.J., Daniel, J.C. and Krishnan, R.S. (1969)  
Incorporation of labeled nucleosides in vitro by rabbit and mink blastocyst  
in the presence of blastokinin of maternal rabbit serum.  
J. Reprod. Fertil., 20 : 256-262.

- Hafen, E., Levine, M., Garber, R.L. and Gehring, W.J. (1983).  
An improved in situ hybridization method for the detection of cellular RNAs in *Drosophila* tissue sections and its application for localizing transcripts of the homeotic. Antennapedia gene complex.  
EMBO J., 2 : 617-623.
- Hudson, P., Penschow, J., Shine, J., Ryan, G., Niall, H. and Coghlan, J. (1981)  
Hybridization histochemistry : use of recombinant DNA as a "homing probe" for tissue localization of specific mRNA populations.  
Endocrinology, 108 : 353-356.
- Jensen, E.V. and Jacobson, H.I. (1962)  
Basic guides to the mechanism of estrogen action.  
Rec. Prog. Horm. Res., 12 : 387-408.
- Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, D.W. and Desombre E. (1968)  
A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59 : 632-638.
- Johnson, M.H. (1972)  
The distribution of a blastokinin-like uterine protein studied by immune fluorescence.  
Fertil. Steril., 23 : 929-939.
- Jordan, V.C., Tate, A.C., Lyman, S.D., Gooden, B., Wolf, M.F., Bain, R.R. and Welshons, W.V. (1985)  
Rat uterine growth and induction of progesterone receptor without estrogen receptor translocation.  
Endocrinology, 116 : 1845-1857.
- Kao, L.W.L. and Bullock, D.W. (1981)  
Rates of uteroglobin synthesis by endometrial explants from different days of early pregnancy in the rabbit.  
Biol. Reprod., 25 : 820-824.
- Kato, J., Onouchi, T. and Okinaga, S. (1978)  
Hypothalamic and hypophysial progesterone receptors : estrogen-priming effect, differential localization, 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone binding, and nuclear receptors.  
J. Steroid. Biochem., 9 : 419-427.
- King, W.J. and Greene, G.L. (1984)  
Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells.  
Nature, 307 : 745-747.

Kirchner, C. (1972)

Immune histologic studies on the synthesis of a uterine specific protein in the rabbit and its passage through the blastocyst coverings.

Fertil. Steril., 23 : 131-136.

Kirchner, C. (1976a)

Uteroglobin in the rabbit. I. Intracellular localization in the oviduct uterus and preimplantation blastocyst.

Cell Tissue Res., 170 : 415-424.

Kirchner, C. (1976b)

Uteroglobin in the rabbit. II. Intracellular localization in the uterus after hormone treatment.

Cell Tissue Res., 170 : 425-434.

Kirchner, C. and Schroer, H.G. (1976)

Uterine secretion like proteins in the seminal plasma of the rabbit.

J. Reprod. Fertil., 47 : 325-330.

Kirchner, C. (1979)

Immunohistochemical localization of secretory proteins in the endometrial epithelium of the rabbit.

Cell Tissue Res., 199 : 25-36.

Krishnan, R.S. and Daniel, J.C. (1967)

"Blastokinin" : inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus.

Science, 158 : 490-492.

Leavitt, N.W. and Blaha, G.C. (1972)

An estrogen-stimulated progesterone binding system in the hamster uterus and vagina.

Steroids, 19 : 263-274.

Leavitt, W.W., Toft, D.O., Strott, C.A. and O'Malley, B.W. (1974)

A specific progesterone receptor in the hamster uterus : physiologic properties and regulation during the estrous cycle.

Endocrinology, 94 : 1041-1053.

Logeat, F., Vu Hai, M.T., Fournier, A., Legrain, P., Buttin, P. and Milgrom, E. (1983)

Monoclonal antibodies to rabbit progesterone receptor : cross-reaction with other mammalian progesterone receptors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 : 6456-6459.

Logeat, F. (1984)

Purification et propriétés antigéniques du récepteur de la progestérone de la lapine.

Thèse de Doctorat d'Etat es-sciences Naturelles, Paris VI.

- Loosfelt, H., Fridlansky, F., Atger, M. and Milgrom, E. (1981a)  
A possible non transcriptional effect of progesterone.  
J. Steroid. Biochem., 15 : 107-110.
- Loosfelt, H., Fridlansky, F., Savouret, J.F., Atger, M. and Milgrom, E. (1981b)  
Mechanism of action of progesterone in the rabbit endometrium. Induction of  
uteroglobin and its messenger RNA.  
J. Biol. Chem., 256 : 3465-3470.
- Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C. and Quon, D.  
(1978)  
The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA.  
Cell, 15 : 687-701.
- Maurer, R.R. and Beier, H.M. (1976)  
Maternal aging and embryonic mortality in the rabbit. II. Hormonal changes  
in young and aging females.  
J. Reprod. Fertil., 31 : 15-22.
- McGuire, J.L. and Bariso, C.D. (1972)  
Isolation and preliminary characterization of a progestagen specific  
binding. Macromolecule from the 273,000 g supernatant of rat and rabbit  
uteri.  
Endocrinology, 90 : 496-506.
- Milgrom, E., Atger, M. and Baulieu, E.E. (1970)  
Progesterone in uterus and plasma. IV progesterone receptor (s) in guinea-  
pig uterus cytosol.  
Steroids, 16 : 741-764.
- Milgrom, E., Atger, M., Perrot, M. and Baulieu, E.E. (1972)  
Progesterone in uterus and plasma : VI uterus progesterone receptors during  
the estrous cycle and implantation in the guinea pig.  
Endocrinology, 90 : 1071-1078.
- Milgrom, E., Luu Thi, M. and Baulieu, E.E. (1973a)  
Control mechanisms of steroid hormone receptors in the reproductive tract.  
Acta Endocrinol. (Kbh) (Suppl.), 180 : 380-397.
- Milgrom, E., Luu Thi, M., Atger M. and Baulieu, E.E. (1973b)  
Mechanisms regulating the concentration and the conformation of  
progesterone receptors in the uterus.  
J. Biol. Chem., 248 : 6366-6374.
- Mornon, J.P., Fridlansky, F., Surcouf, E., Bally, R. and Milgrom, E. (1978)  
X-Ray analysis of a progesterone binding protein (uteroglobin) preliminary  
results.  
J. Mol. Biol., 122 : 237-239.



- Noske, I.G. and Feigelson, M. (1976)  
Immunological evidence of uteroglobin (Blastokinin) in the mâle reproductive tract and in non reproductive ductal tissues and their sections.  
Biol. Reprod., 15 : 704-713.
- Noske, I.G. and Gooding, M. (1978)  
Evidence of uteroglobin-like protein in epithelial cells of reproductive tissues of the rabbit.  
J. Reprod. Fert., 54 : 193-196.
- O'Malley, B.W. and Means, A.R. (1974)  
Female steroid hormones and target cell nuclei.  
Science, 183 : 610-620.
- O'Malley, B.W., Schwartz, R.J. and Schrader, W.T. (1976)  
A review of regulation of gene expression by steroid hormone receptors.  
J. Steroid. Biochem., 7 : 1151-1157.
- Pasqualini, J.R. and Nguyen, B.L. (1980)  
Progesterone receptors in the fetal uterus and ovary of the guinea pig : evolution during fetal development and induction and stimulation in estradiol primed animals.  
Endocrinology, 106 : 1160-1165.
- Pelc, S.R. (1947)  
Autoradiograph technique.  
Nature, 160 : 749-750.
- Perrot-Applanat, M., Logeat, F., Groyer-Picard, M.T. and Milgrom, E. (1985)  
Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies.  
Endocrinology, 116 : 1473-1484.
- Perrot-Applanat, M., Groyer-Picard, M.T., Logeat, F. and Milgrom, E. (1986)  
Ultrastructural localization of the progesterone receptor by an immunogold method : effect of hormone administration.  
J. Cell. Biol., 102 : 1191-1199.
- Philibert, D. and Raynaud, J.P. (1973)  
Progesterone binding in the immature mouse and rat uterus.  
Steroids, 22 : 89-98.
- Philibert, D. and Raynaud, J.P. (1974a)  
Progesterone binding in the immature rabbit and guinea pig uterus.  
Endocrinology, 94 : 627-632.

- Philibert, D. and Raynaud, J.P. (1974b)  
Binding of progesterone and R 5020, a highly potent progestin, to human endometrium and myometrium.  
Contraception, 10 : 457-466.
- Ponstingl, H., Nieto, A. and Beato, M. (1978)  
Amino acid sequence of progesterone-induced rabbit uteroglobin.  
Biochemistry, 17 : 3908-3912.
- Popp, R.A., Foresman, K.R., Wise, L.D. and Daniel, J.C. Jr (1978)  
Amino acid sequence of a progesterone binding protein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 : 5516-5519.
- Punnonen, R., Lukola, A. and Puntala, P. (1983)  
Lack of estrogen and progestin receptors in the urinary bladder of women.  
Horm. Metabol. Res., 15 : 464-465.
- Quirck, S.J., Gannel, J.E. and Funder, J.W. (1982)  
Progesterone receptors in mammary gland of the pregnant rat.  
Endocrinology, 111 : 1883-1890.
- Raj-Kumar, K., Bigsby, R., Lieberman, R. and Gerschenson, L.E. (1983a)  
Uteroglobin production by cultured rabbit uterine epithelial cells.  
Endocrinology, 112 : 1490-1499.
- Raj-Kumar, K., Bigsby, R., Lieberman, R. and Gerschenson, L.E. (1983b)  
Effect of progesterone and 17  $\beta$ -estradiol on the production of uteroglobin by cultured rabbit uterine epithelial cells.  
Endocrinology, 112 : 1499-1505.
- Rao, B.R., Wiest, W.G. and Allen, W.M. (1973)  
Progesterone "receptor" in rabbit uterus I. Characterization and oestradiol 17  $\beta$  augmentation.  
Endocrinology, 92 : 1229-1240.
- Raynaud, J.P. (1977)  
R 5020, a tag for the progestin receptor.  
In : Progesterone receptors in normal and neoplastic tissues, Mc Guire, W.L., Raynaud, J.P. and Baulieu, E.E.  
(Eds), Raven Press, New York, 9-21.
- Robbero, L. (1973)  
Effect of progesterone in vivo upon rate of cleavage of mouse embryos.  
J. Reprod. Fertil., 35 : 153-155.
- Sar, M. and Stumpf, W.E. (1974)  
Cellular and subcellular localization of  $^3\text{H}$  progesterone or its metabolites in the oviduct, uterus, vagina and liver of the guinea pig.  
Endocrinology, 94 : 1116-1125.

- Savouret, J.F., Loosfelt, H., Atger, M. and Milgrom, E. (1980)  
Differential hormonal control of a messenger RNA in two tissues.  
Uteroglobin mRNA in the lung and the endometrium.  
J. Biol. Chem., 255 : 4131-4136.
- Sheridan, P.J. and Mc Gill, H.C. Jr (1984)  
The nuclear uptake and retention of a synthetic progestin in the  
cardiovascular system of the baboon.  
Endocrinology, 114 : 2015-2019.
- Tardy, J. and Pasqualini, J.R. (1980)  
Autoradiographic studies on the fetal and newborn uteri of the guinea pig  
after injection of  $^3\text{H}$  progesterone into non treated and into estradiol  
primed animals.  
Cell Tissue Res., 213 : 213-220.
- Torkkeli, T.K., Krusius, T. and Jänne, O.A. (1978)  
Uterine and lung uteroglobin in the rabbit. Two identical proteins with  
differential hormonal regulation.  
Biochem. Biophys. Acta., 544 : 578-592.
- Tranchant, O. (1982)  
Mise au point d'une technique d'hybridation in situ pour localiser l'ARN  
messager de l'utéroglobine à partir de l'ADN complémentaire tritié.  
D.E.A., Université des Sciences et Techniques de Lille.
- Vu Hai, M.T. and Milgrom, E. (1978a)  
Characterization and assay of the progesterone receptor in rat uterine  
cytosol.  
J. Endocr., 76 : 21-31.
- Vu Hai, M.T. and Milgrom, E. (1978b)  
Characterization and assay of the progesterone receptor in rat uterine  
nuclei.  
J. Endocr., 76 : 33-41.
- Vu Hai, M.T., Logeat, F. and Milgrom, E. (1978)  
Progesterone receptors in the rat uterus : variations in cytosol and nuclei  
during the oestrous cycle and pregnancy.  
J. Endocr., 76 : 43-48.
- Warembourg M. (1970)  
Fixation de l'oestradiol  $^3\text{H}$  au niveau des noyaux amygdaliens septaux et du  
système hypothalamo-hypophysaire chez la souris femelle  
C.R. Acad. Paris, 270 : 152-154.
- Warembourg, M. et Milgrom, E. (1971)  
Etude radioautographique des sites de fixation de la progesterone  $^3\text{H}$  au  
niveau de l'utérus de cobaye.  
C.R. Acad. Sc. Paris, 273 : 891-893.

Warembourg, M. (1974)

Radioautographic study of the guinea pig uterus after injection and incubation with ( $^3\text{H}$ ) progesterone.  
Endocrinology, 94 : 665-670.

Warembourg, M. (1978)

Radioautographic study of the rat brain, uterus and vagina after ( $^3\text{H}$ ) R 5020 injection.  
Mol. and Cell. Endocr., 12 : 67-79.

Warembourg, M. (1979)

Etude radioautographique de la fixation d'hormones stéroïdes tritiées (oestradiol, progestérone, promégestone, corticostérone, dexaméthasone) au niveau du système nerveux central, de l'hypophyse et du tractus génital chez divers mammifères.  
Thèse de Doctorat d'état es-sciences Naturelles. Université des Sciences et Techniques de Lille.

Warembourg, M. (1983)

Progestagen-concentrating cells in the brain, uterus, vagina and mammary glands of the galago.  
J. Reprod. Fert., 68 : 189-193.

Warembourg, M. and Milgrom, E. (1977)

Radioautography of the uterus and vagina after ( $^3\text{H}$ ) progesterone injection into guinea pig at various periods of the estrous cycle.  
Endocrinology, 100 : 175-181.

Warembourg, M., Tranchant, O., Perret, C. and Thomasset, M. (1985a)

Localisation par hybridation in situ des ARNm de la cholecalcine (Ca BP 9-KDa) dans le duodénum et le placenta chez le rat.  
Communication affichée. Colloque INSERM, Bligny sur Ouche.

Warembourg, M., Tranchant, O., Perret, C. and Thomasset, M. (1985b)

Localisation par hybridation in situ des ARNm de la cholecalcine (Ca BP 9-KDa) dans le duodénum et le placenta chez le rat.  
Communication affichée. Colloque INSERM, Paris.

Warembourg, M., Tranchant, O., Perret, C., Desplan, C. and Thomasset, M. (1986a)

In situ detection of vitamin D-induced calcium binding protein (9-KDa Ca BP) messenger RNA in rat duodenum.  
J. Histochem. Cytochem., 34 : 277-280.

Warembourg, M., Tranchant, O., Atger, M. and Milgrom, E. (1986b)

Uteroglobin messenger RNA : localization in rabbit uterus and lung by in situ hybridization.  
Endocrinology, 119 : 1632-1640.

Weaker, F.J. and Sheridan, P.J. (1984)

Localization of a synthetic progestin in the reproductive organs of the female baboon.

Anat. Rec., 209 : 53-57.

Wekshons, W.V., Lieberman, M.E. and Gorski, J. (1984)

Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors.

Nature, 307 : 747-749.

Whitten, W.K. (1957)

The effect of progesterone on the development of mouse eggs in vitro.

J. Endocrinol., 16 : 80-84.

Young, P.C.M. and Clearly, R.E. (1974)

Characterization and properties of progesterone-binding components in human endometrium.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 39 : 425-439.

